

Amplificazione/Clonazione

Ibridazione/Sonda

Sequenziamento

Clonazione del DNA

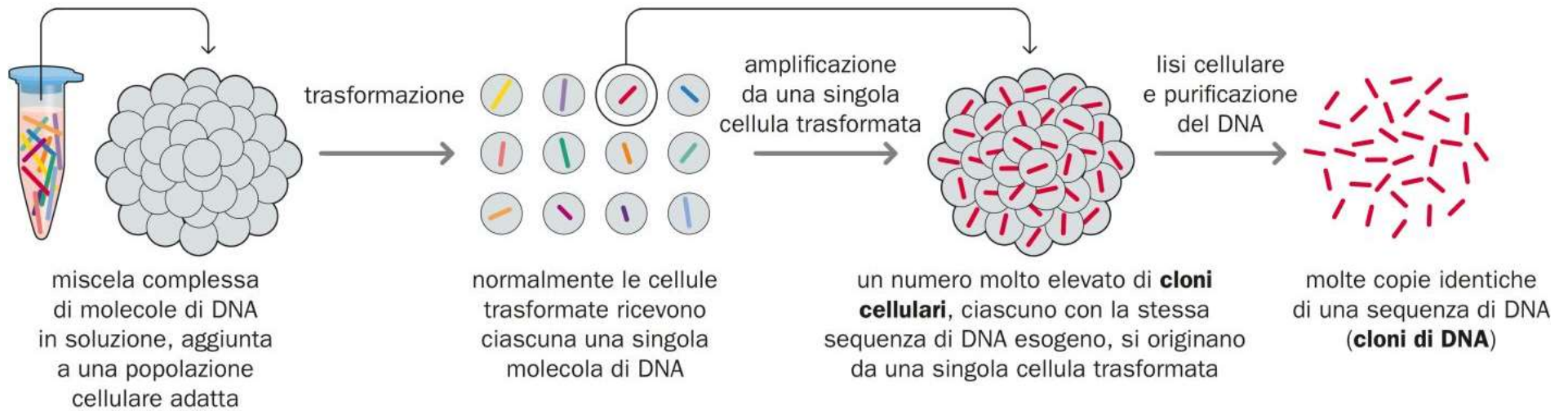
DNA eterologo inserito in vettori capaci di auto-replicarsi

Vettori ricombinanti inseriti in ospiti batterici

Amplificazione del plasmide ricombinante in molte copie

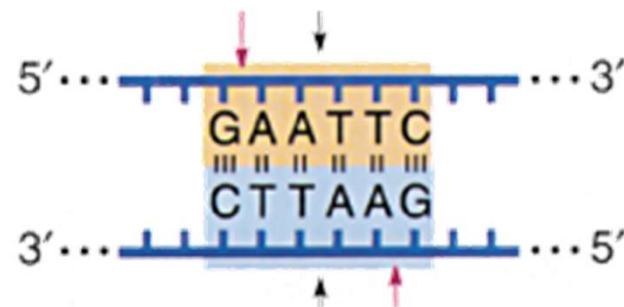
PCR- reazione a catena della polimerasi

Clonazione del DNA in batteri



Enzimi di restrizione

Endonucleasi di origine batterica in grado di tagliare il DNA in specifici siti palindromici.



Clonazione del DNA in batteri

La frequenza con cui l'enzima di restrizione taglia il DNA, e quindi la dimensione dei frammenti che si ottengono, dipende dalla lunghezza in basi del sito di riconoscimento (Sito di restrizione)

$1/4^n$ a n = numero di basi nella sequenza di restrizione

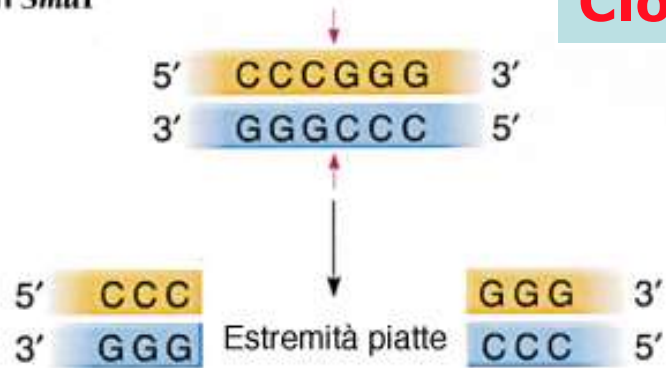
Sito di 4 basi= 1 taglio ogni 256 basi ($1/4^4$)

Sito di 6 basi= 1 taglio ogni 4096 basi ($1/4^6$)

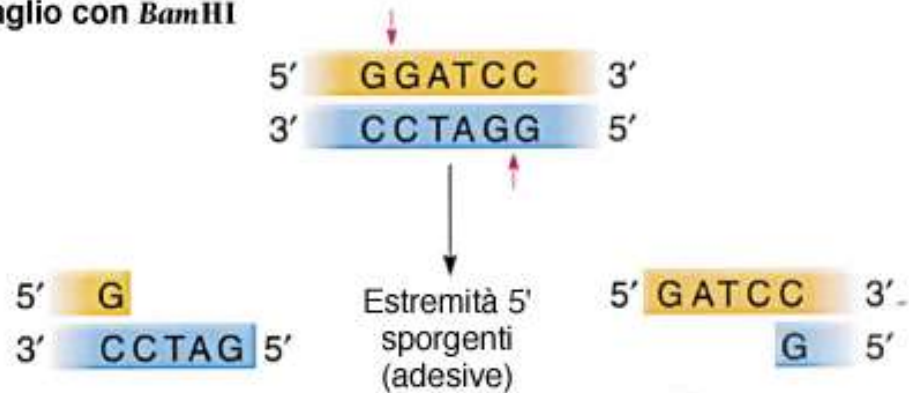
Sito di 8 basi= 1 taglio ogni 65.476 basi $1/(4^8)$

Clonazione del DNA in batteri

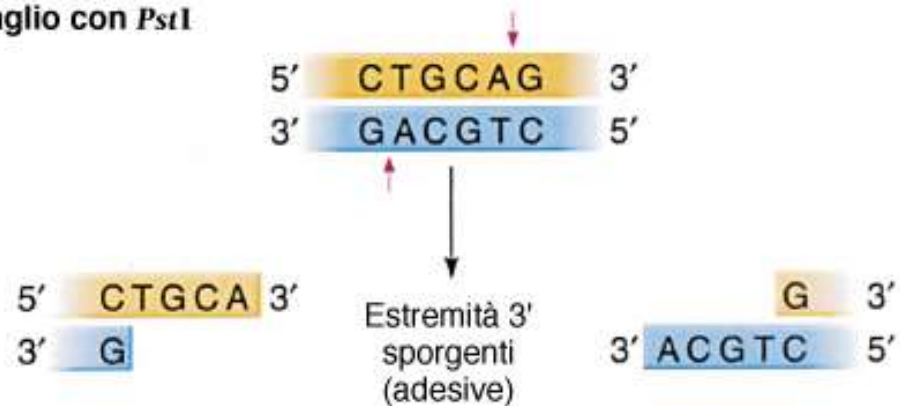
a) Taglio con *Sma*I



b) Taglio con *Bam*HI



c) Taglio con *Pst*I

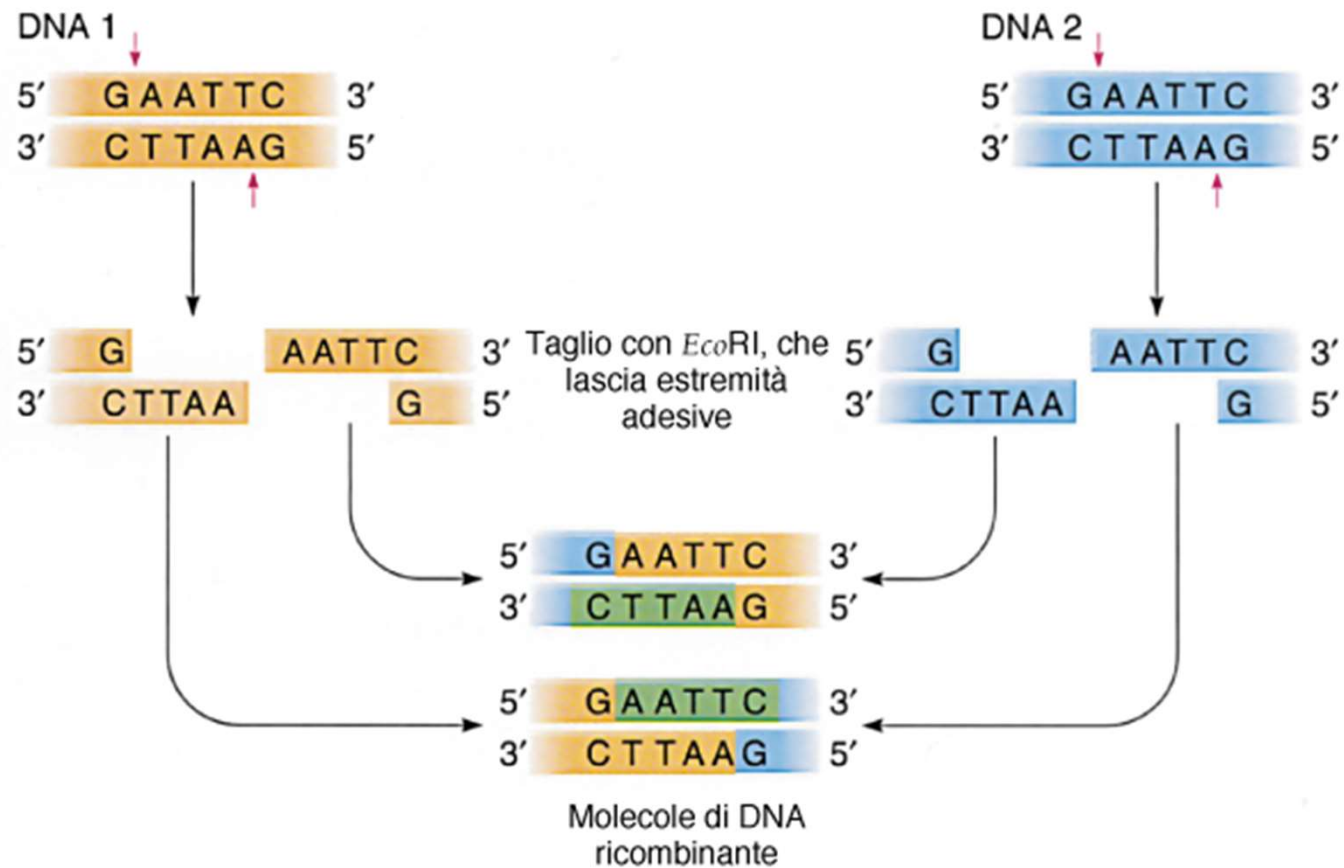


Gli enzimi di restrizione producono frammenti con estremità diverse

Enzima	Sito di riconoscimento	N. basi	Estremità prodotte	Origine dell'enzima
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	6	5' sporgente	<i>Escherichia Coli</i>
<i>BamHI</i>	G/GATCC	6	5' sporgente	<i>Bacillus Amyloliquefaciens H</i>
<i>BglII</i>	A/GATCT	6	5' sporgente	<i>Bacillus globigii</i>
<i>PstI</i>	CTGCA/G	6	3' sporgente	<i>Providencia stuartii</i>
<i>XmaI</i>	C/CCGGG	6	5' sporgente	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	6	piatte	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Sau3A</i>	/GATC	4	5' sporgente	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>AluI</i>	AG/CT	4	piatte	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC	8	5' sporgente	<i>Nocardia odititis</i>
<i>PacI</i>	TTAAT/TAA	8	3' sporgente	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>

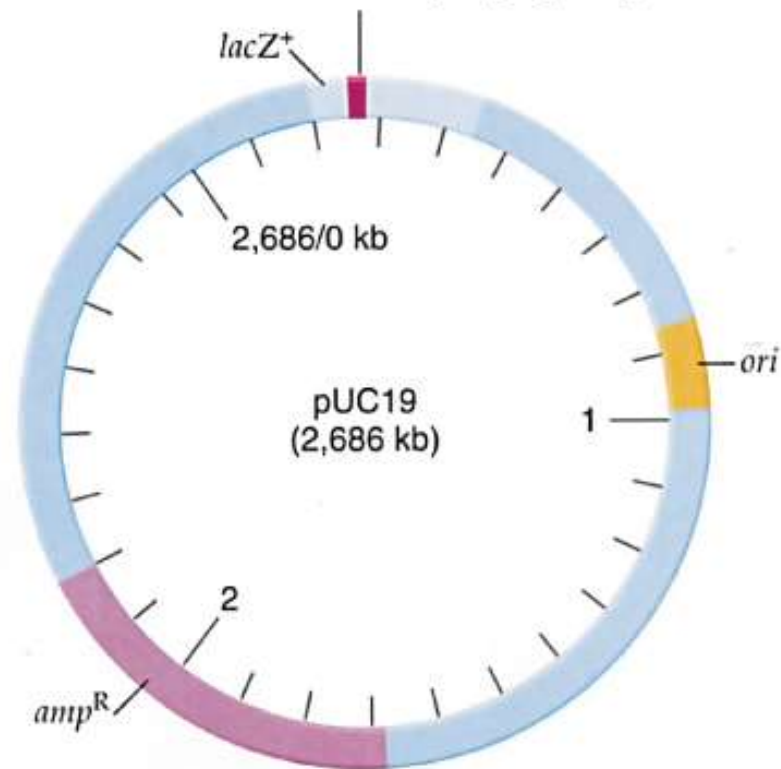
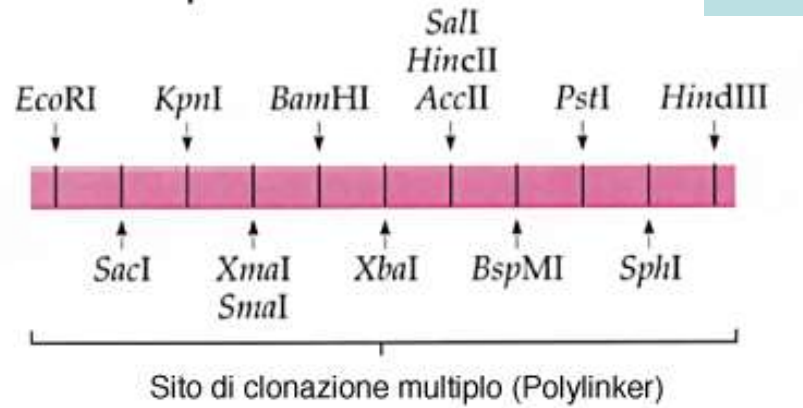
Clonazione del DNA in batteri

Creazione di una molecola di DNA ricombinante



Clonazione del DNA in batteri

Vettore di clonazione pUC19

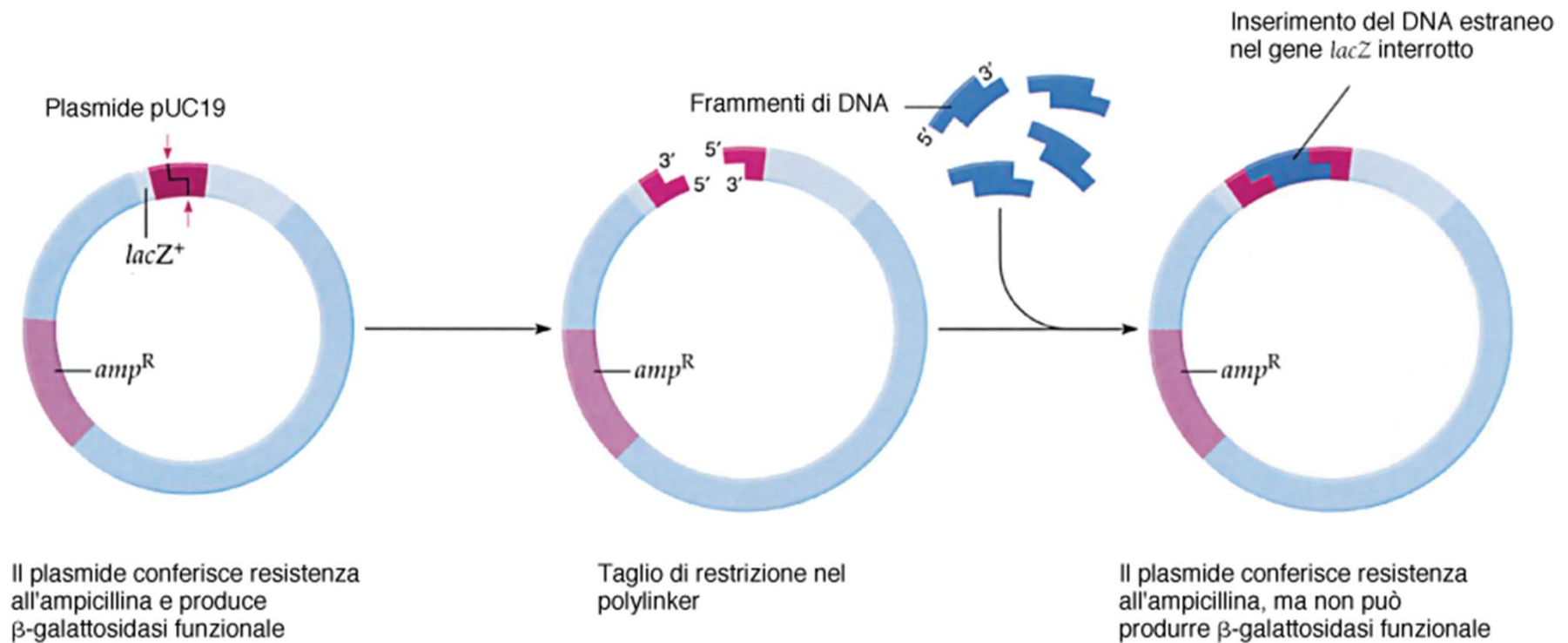


- ori* = Sequenza di origine di replicazione
- amp^R* = Gene per la resistenza alla ampicillina
- lacZ⁺* = Parte del gene per la β -galattosidasi

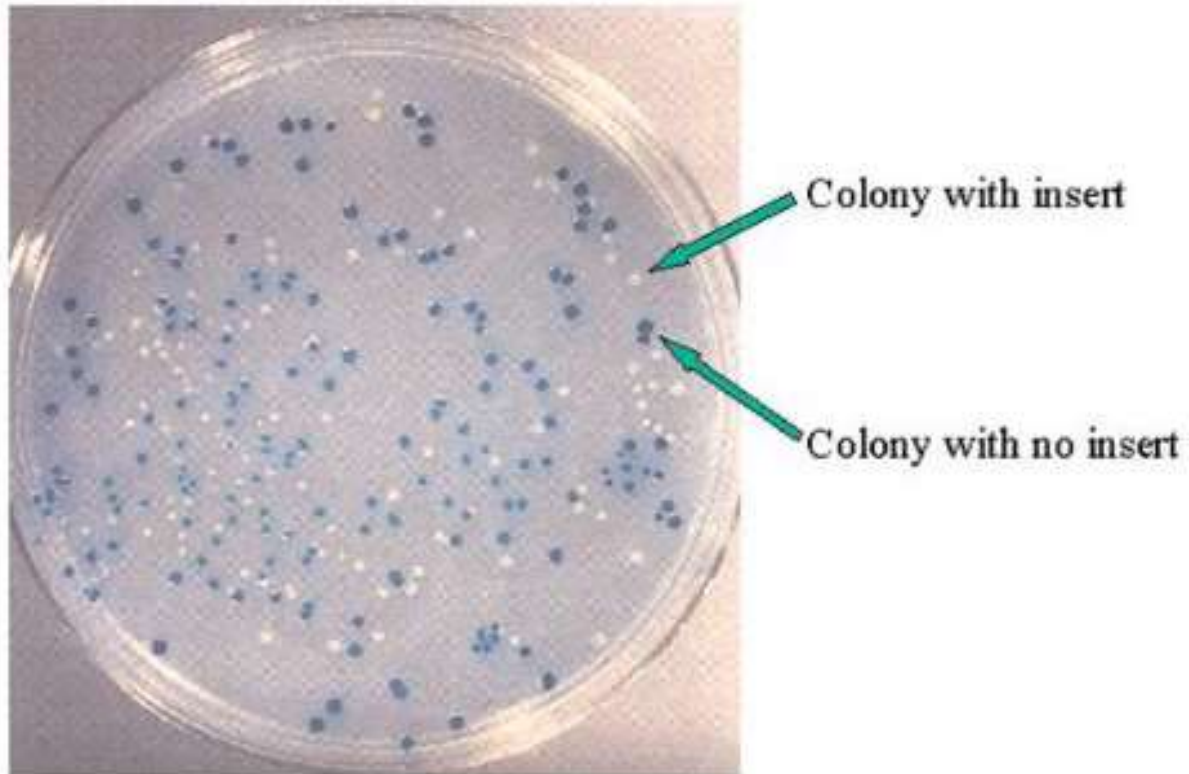
Clonazione di DNA:
vettori plasmidici

Clonazione del DNA in batteri

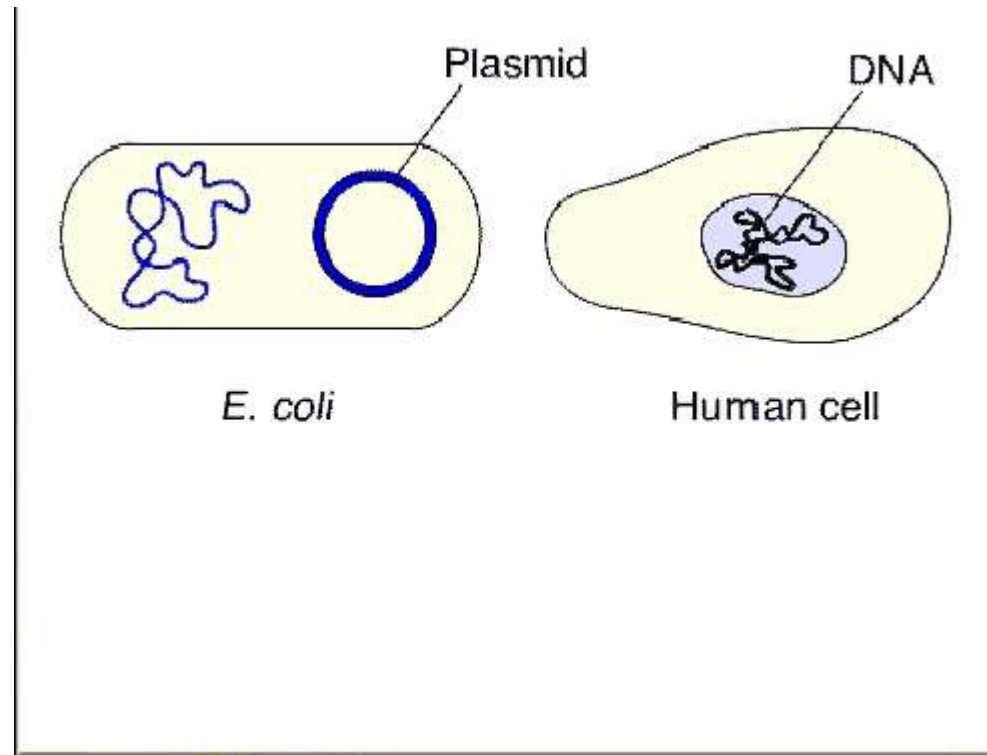
Clonaggio di DNA eterologo in PUC19



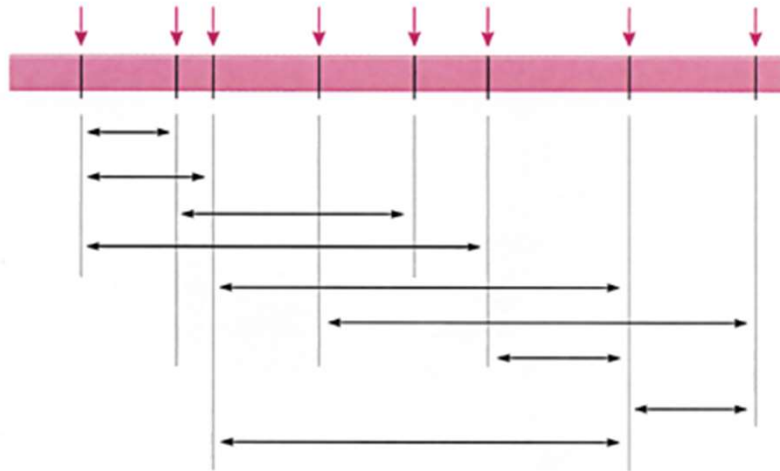
Clonazione del DNA in batteri



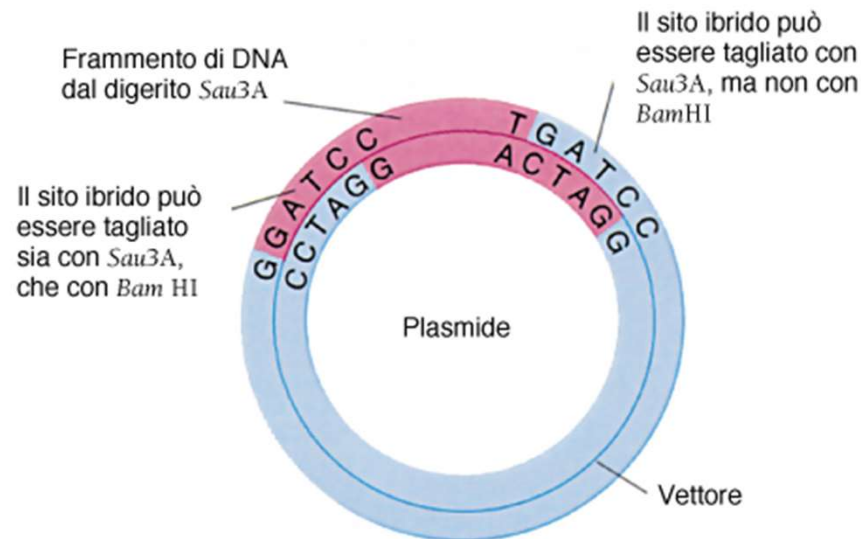
Clonazione del DNA in batteri



a) Digestione parziale di DNA con un enzima di restrizione, per es. *Sau3A*, che genera una serie di frammenti sovrapposti, ciascuno con estremità appiccicose identiche 5' GATC



b) I frammenti risultanti possono essere inseriti nel sito *Bam*HI del vettore plasmidico

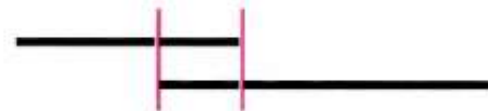


Realizzazione di una banca genomica in vettore plasmidico

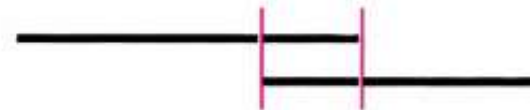
**Realizzazione di una
libreria genomica
ordinata**



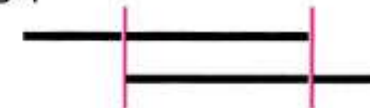
(a) Il clone 1 ibrida al clone 2

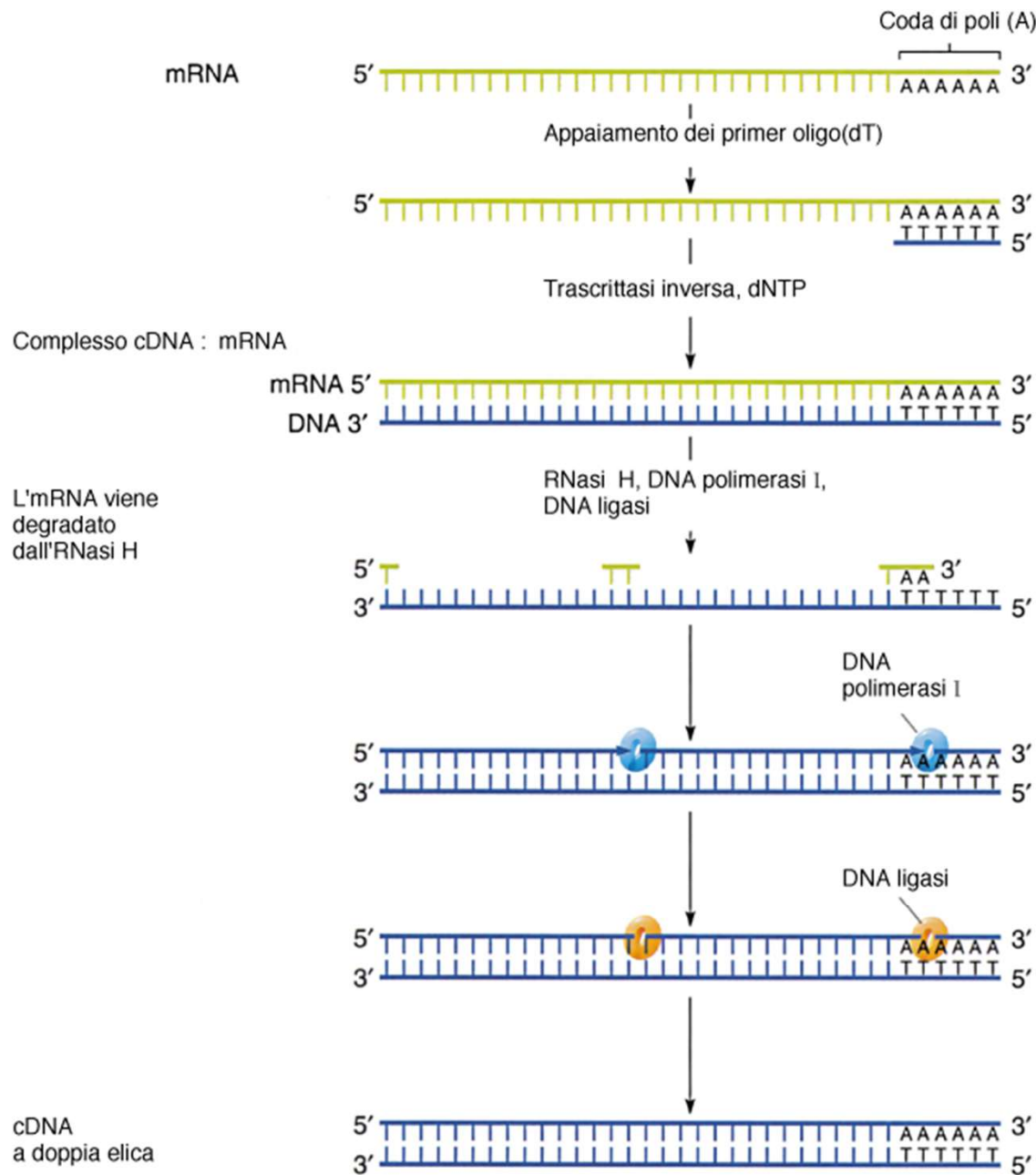


(b) Il clone 2 ibrida al clone 3



(c) Il clone 3 ibrida al clone 4





Realizzazione di una banca di cDNA: retrotrascrizione di mRNA

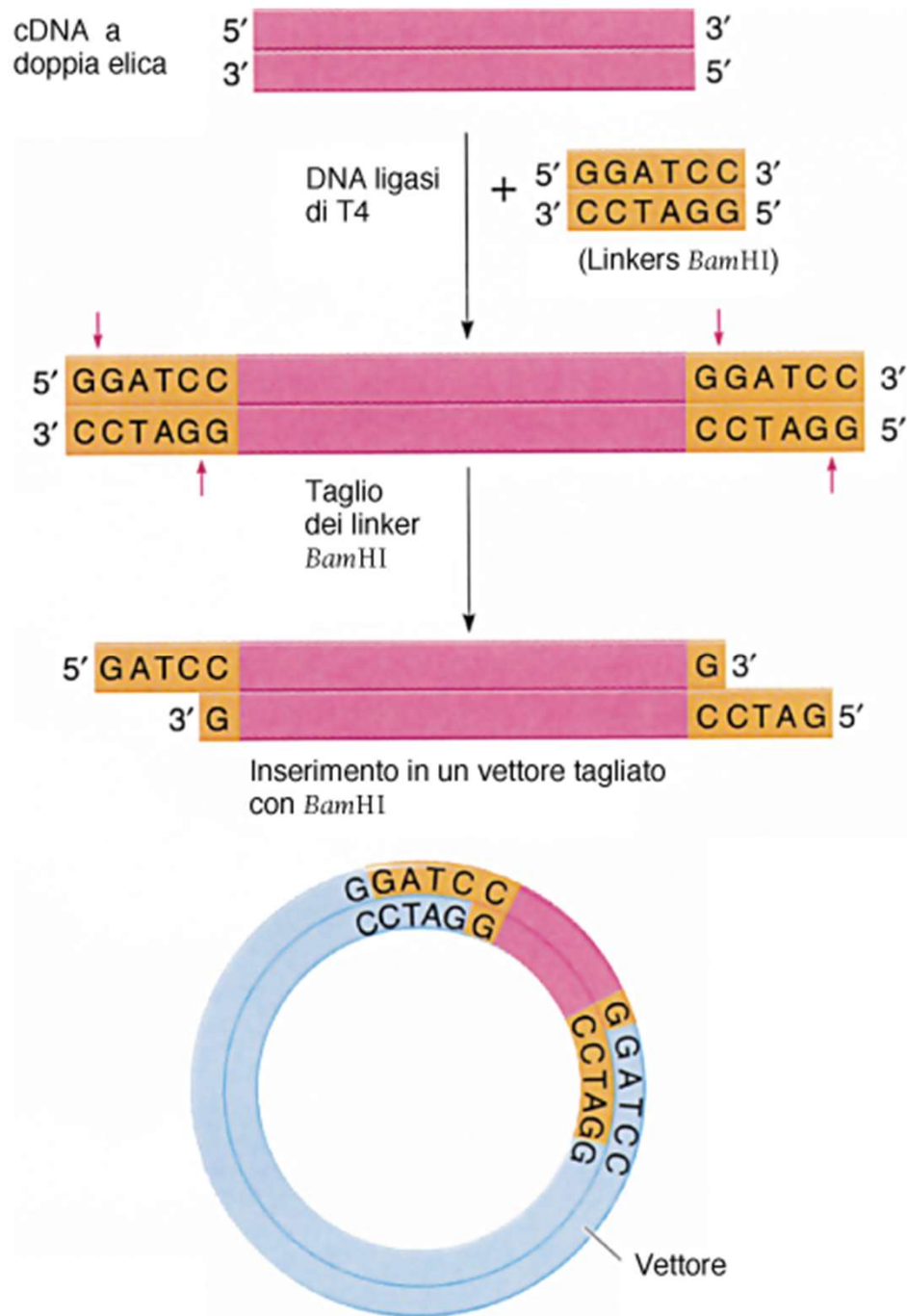
Frammenti di RNA degradato vengono usati come primer per nuova sintesi di DNA

La DNA polimerasi I sintetizza a pezzi una nuova elica di DNA e rimuove gli RNA primer

I frammenti di DNA vengono legati dalla DNA ligasi

Librerie di DNA

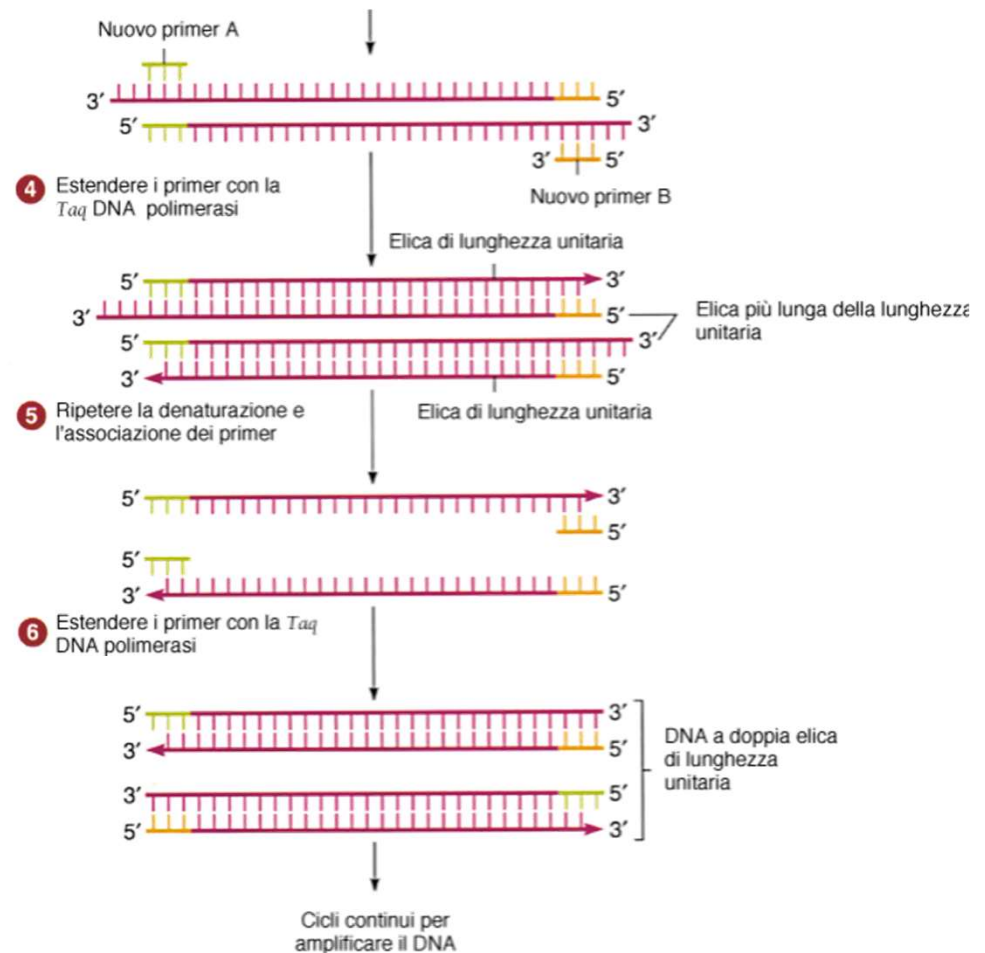
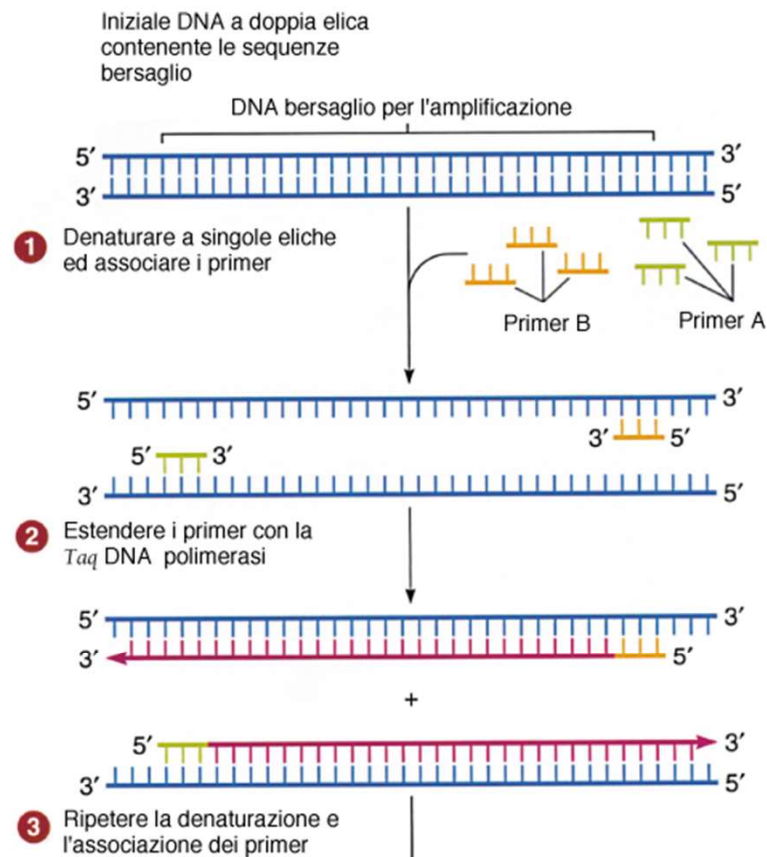
Realizzazione di una banca di cDNA : clonazione dei cDNA in vettori plasmidici



Clonazione del DNA in vitro

Reazione a catena della Polimerasi PCR

Mullis- Nobel 1993



**Polymerase Chain
Reaction**

Lo strumento della Real-time PCR consiste di TRE component principali:

1. Un termociclatore (PCR machine)
2. Un modulo ottico (che raccoglie la fluorescenza direttamente durante la reazione di PCR)
3. Un Computer (che traduce la fluorescenza in valori numerici)

RTqPCR exp. LIVER + captisol/ BIX02-189 seconda estrazione RNA
27.09.22

	L34	A7728 CAPT	0,48048	0,00781	0,00781	24,52	0,02344						
	L34	A7729 CAPT	0,63716	0,00684	0,00684	24,11	0,01549						
	L34	A7730 CAPT	0,87314	0,01419	0,01419	23,66	0,02345						
	L34	A7731 BIX	0,70741	0,02023	0,02023	23,96	0,04125						
	L34	A7732 BIX	1,00000	0,01012	0,01012	23,46	0,01461						
	L34	A7733 BIX	0,56467	0,01068	0,01068	24,29	0,02729						
	CTGF	A7728 CAPT	0,09972	0,00266	0,00266	28,23	0,03847			0,07651			
	CTGF	A7729 CAPT	0,31485	0,00529	0,00529	26,57	0,02422			0,182168	0,209726		1
	CTGF	A7730 CAPT	0,87750	0,01815	0,01815	25,09	0,02983			0,370502			
	CTGF	A7731 BIX	0,68016	0,01547	0,01547	25,46	0,03281			0,354455			
	CTGF	A7732 BIX	0,85369	0,00773	0,00773	25,13	0,01306			0,31472	0,440682		2,101224
	CTGF	A7733 BIX	1,00000	0,02041	0,02041	24,90	0,02945			0,652871			
	CYR61	A7728 CAPT	0,20697	0,00816	0,00816	25,38	0,05687			0,550638			
	CYR61	A7729 CAPT	0,22964	0,00101	0,00101	25,23	0,00632			0,460699	0,825113		1
	CYR61	A7730 CAPT	1,00000	0,01513	0,01513	23,11	0,02183			1,464001			
	CYR61	A7731 BIX	0,52429	0,01709	0,01709	24,04	0,04702			0,947367			
	CYR61	A7732 BIX	0,70061	0,00558	0,00558	23,62	0,01150			0,895564	1,15826		1,403759
	CYR61	A7733 BIX	0,72086	0,01160	0,01160	23,58	0,02321			1,631848			
	DDIT4	A7728 CAPT	0,09092	0,00454	0,00454	30,45	0,07205			0,01643			
	DDIT4	A7729 CAPT	0,11583	0,00766	0,00766	30,10	0,09537			0,015784	0,026444		1
	DDIT4	A7730 CAPT	0,47383	0,00523	0,00523	28,06	0,01591			0,047119			
	DDIT4	A7731 BIX	0,71676	0,03919	0,03919	27,47	0,07889			0,087974			
	DDIT4	A7732 BIX	1,00000	0,01828	0,01828	26,99	0,02638			0,086827	0,081721		3,090308
	DDIT4	A7733 BIX	0,45760	0,02282	0,02282	28,11	0,07196			0,070362			
	ANK 1	A7728 CAPT	0,25523	0,01133	0,01133	26,00	0,06404			0,357476			
	ANK 1	A7729 CAPT	0,40142	0,00096	0,00096	25,35	0,00344			0,423966	0,385648		1
	ANK 1	A7730 CAPT	0,48720	0,03105	0,03105	25,07	0,09194			0,375501			
	ANK 1	A7731 BIX	0,56801	0,01987	0,01987	24,85	0,05046			0,540338			
	ANK 1	A7732 BIX	1,00000	0,00929	0,00929	24,03	0,01340			0,672948	0,647038		1,677794
	ANK 1	A7733 BIX	0,61072	0,05959	0,05959	24,74	0,14078			0,727826			

Amplificazione/Clonazione

Ibridazione/Sonda

Sequenziamento

Sonda molecolare a DNA

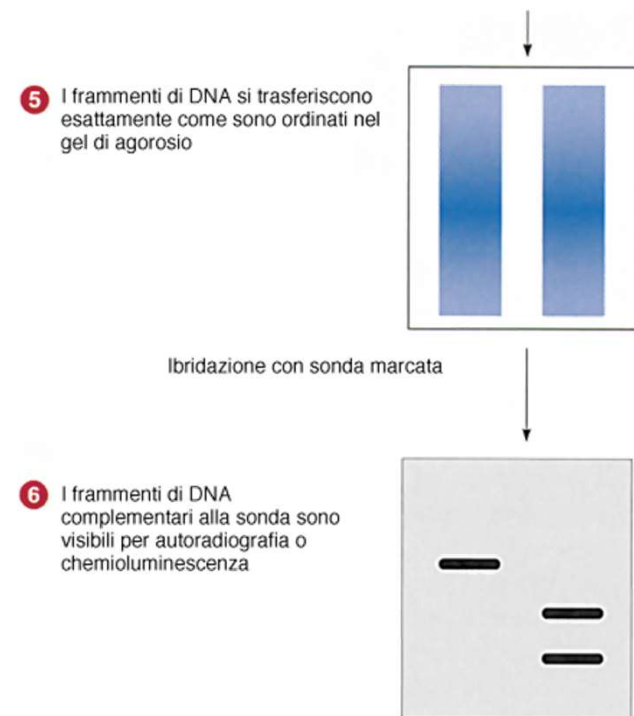
Sonde radioattive o "calde", marcate con **radioisotopi**, le più sensibili (picogrammo).

Le sonde "fredde" sono marcate con **biotina**, una vitamina idrosolubile (vitamina H) che si lega alle basi e con **digossigenina**, uno steroide vegetale che modifica chimicamente nucleotidi pirimidinici.

La biotina viene riconosciuta da una proteina batterica, la **streptavidina**, con la quale instaura un legame ad affinità talmente elevata da essere considerato uno dei più forti conosciuti in biologia.

La digossigenina incorporata nei nucleotidi pirimidinici viene invece legata da un **anticorpo specifico**.

La visualizzazione dell'interazione sonda-molecola bersaglio avviene però solo se la streptavidina e l'anticorpo anti-digossigenina sono coniugati con **fluoròfori** o **enzimi** (come la fosfatasi alcalina e la perossidasi) che permettano l'emissione di luce o la produzione di un colore in saggi di chemiluminescenza o colorimetrici.



Le sonde sono usate per identificare (saggi di ibridazione) o isolare (saggi di purificazione) sequenze specifiche in una popolazione eterogenea di DNA.

**Si può frammentare con enzimi di
restrizione tutto il DNA genomico
e valutarne specifici profili di frammenti
di restrizione**

SOUTHERN BLOTTING

Saggi di ibridazione



Un sito di restrizione, e quindi il profilo di restrizione di un pezzo di DNA digerito con il relativo enzima di restrizione, può variare per:

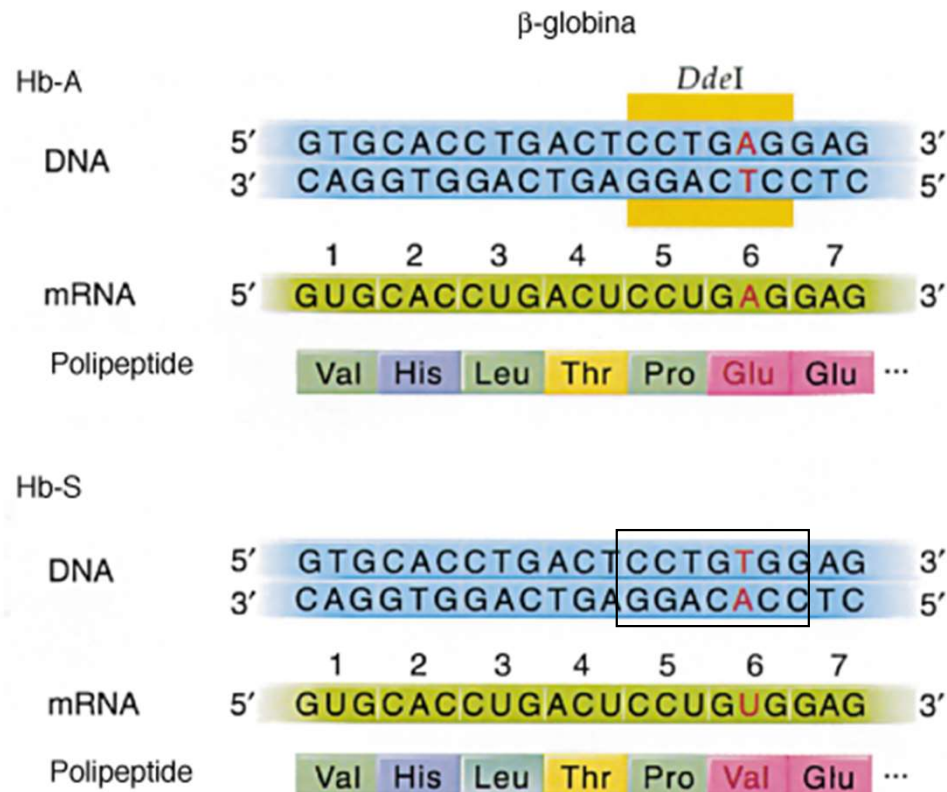
- Mutazioni

- Polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs)

Diagnosi di malattia genetica la
cui mutazione patogenetica
altera un sito di restrizione:

l'esempio dell'**anemia falciforme**

Gene della globina β normale (Hb-A) e della globina β mutata dell'anemia falciforme (Hb-S)

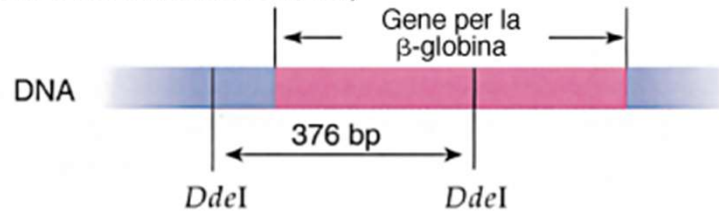


La mutazione (causa della malattia) modifica un sito di restrizione

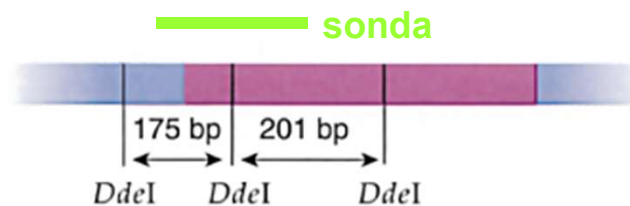
Saggi di ibridazione

a) Siti di restrizione *DdeI*

β^S (Allele mutante dell'anemia falciforme)



β^A (Allele normale)



Il Southern Blotting permette di fare diagnosi molecolare di malattia

Diagnosi di malattia genetica
ASSOCIATA ad un polimorfismo
non patogenetico:

l'esempio della **fibrosi cistica**

Quando il gene responsabile della malattia non è noto la diagnosi può servirsi del **Polimorfismo di Lunghezza dei Frammenti di Restrizione (RFLP)**

Alcuni siti di restrizione del genoma sono polimorfici (SNPs).

Un particolare polimorfismo può essere strettamente associato ad un gene patologico (di cui si ignora sequenza e mutazione) e quindi segregare con esso.

Più il sito polimorfico è vicino al gene malattia, più sarà improbabile che un evento di crossing over in meiosi separi e faccia segregare indipendentemente i due caratteri.

L'analisi degli RFLP consiste:

- § nell'analizzare le sequenze non codificanti adiacenti a un gene
- § nel tipizzarle mediante digestione con enzimi di restrizione
- § nel confrontare i risultati della frammentazione nei soggetti appartenenti a un medesimo nucleo familiare.

L'utilizzo di sonde specifiche per le regioni adiacenti il gene contenenti siti di restrizione polimorfici possono evidenziare l'associazione tra uno specifico RFLP e il fenotipo patologico.

Quelle sonde potranno essere utilizzate per la diagnosi.

Saggi di ibridazione

Gli RFLP possono servire all'identificazione, isolamento e caratterizzazione di un gene malattia

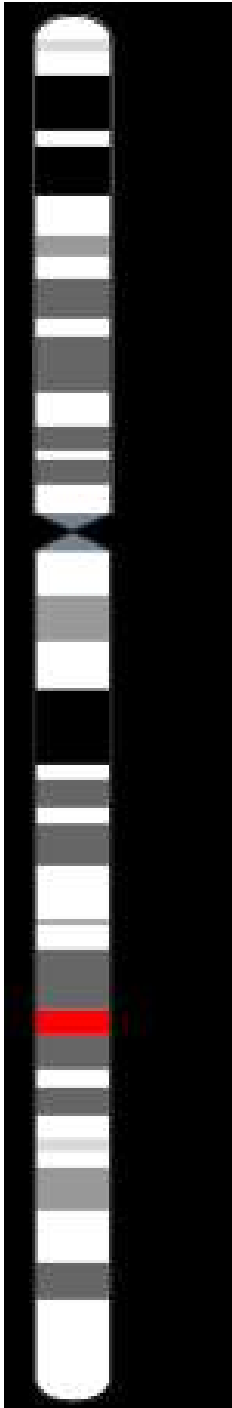
Intere famiglie con alta incidenza di fibrosi cistica furono studiate per la presenza di polimorfismi di siti di restrizione strettamente associati alla malattia.

Un marcatore RFLP che segregava debolmente con il gene malattia fu utilizzato per individuare il cromosoma su cui è situato il gene CF (cromosoma 7).

Furono usati quindi RFLP noti del cromosoma 7 tra cui ne furono individuati due strettamente associati al gene malattia (7q31-32).

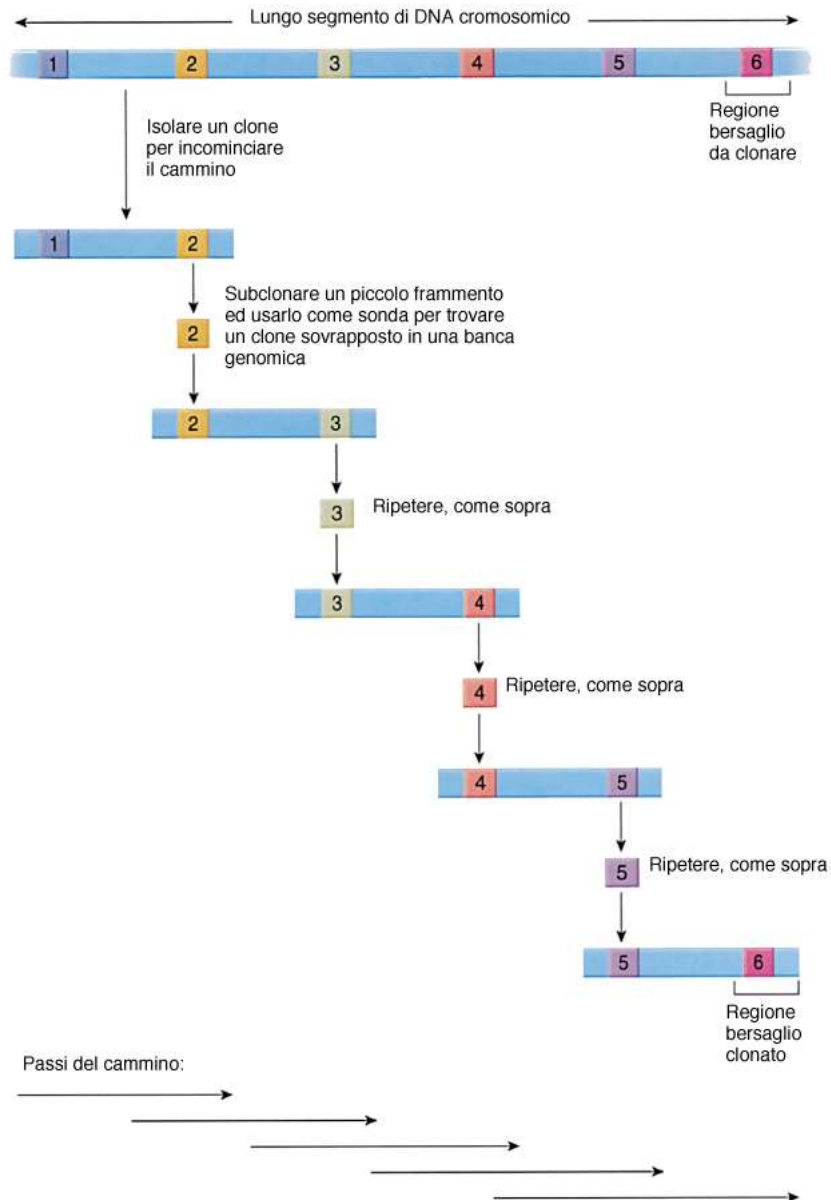
**Saggi di
ibridazione**

Cromosoma 7



Gene della fibrosi cistica

Saggi di ibridazione



Il gene della Fibrosi Cistica fu identificato tramite "Chromosome Walking", cioè camminando sul cromosoma 7

Saggi di ibridazione

Nel 68% dei pazienti la malattia è associata alla delezione di 3 nt successivi con conseguente perdita dell'aminoacido fenilalanina nella proteina.

Nel resto dei pazienti si sono ritrovate più di 60 mutazioni diverse.

La sequenza del gene e della proteina prodotta ha permesso l'elaborazione di un'analisi computerizzata che ha individuato due domini proteici: uno transmembrana e uno di legame all'ATP.

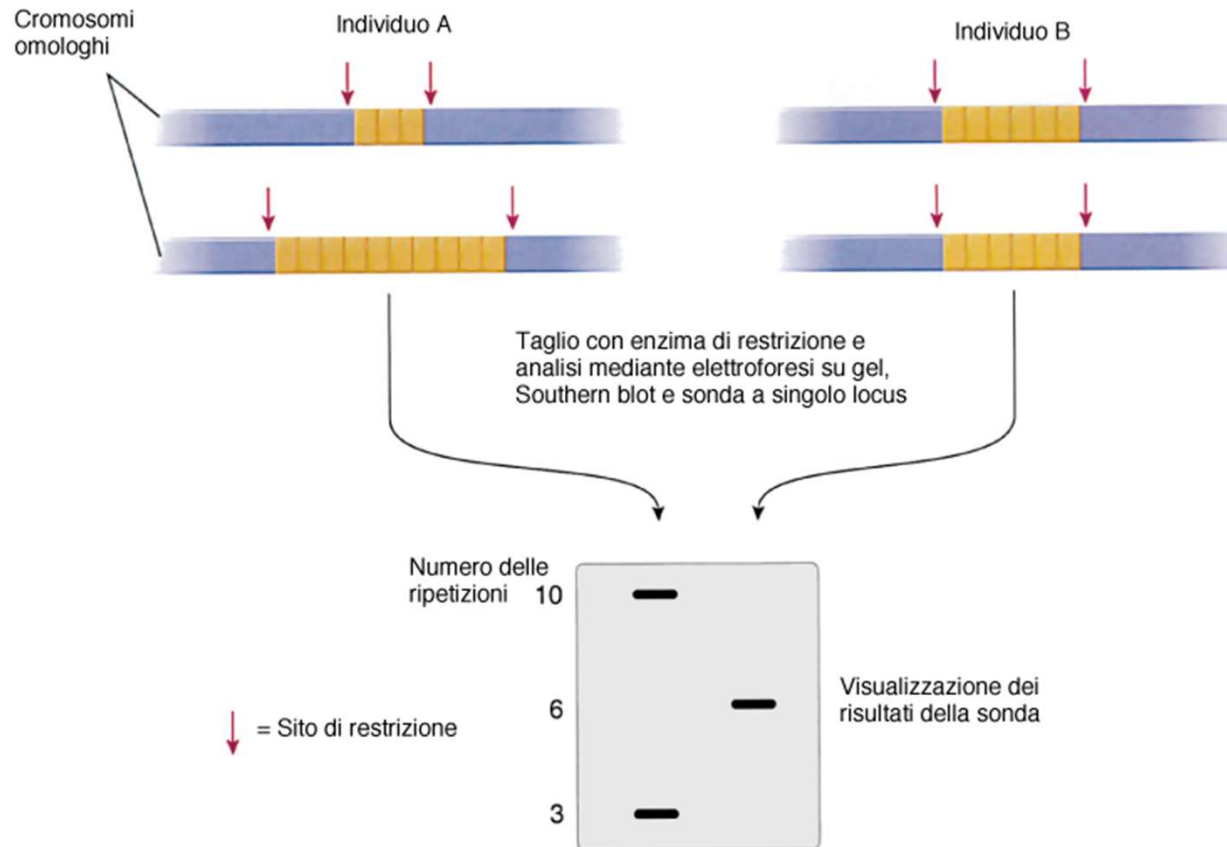
La mutazione più frequente colpisce proprio la parte centrale del dominio transmembrana.

Utilizzo di RFLP per tipizzazione del DNA:

Gli esempi dell' **Attribuzione di paternità e dell'Identificazione dell'autore di un delitto**

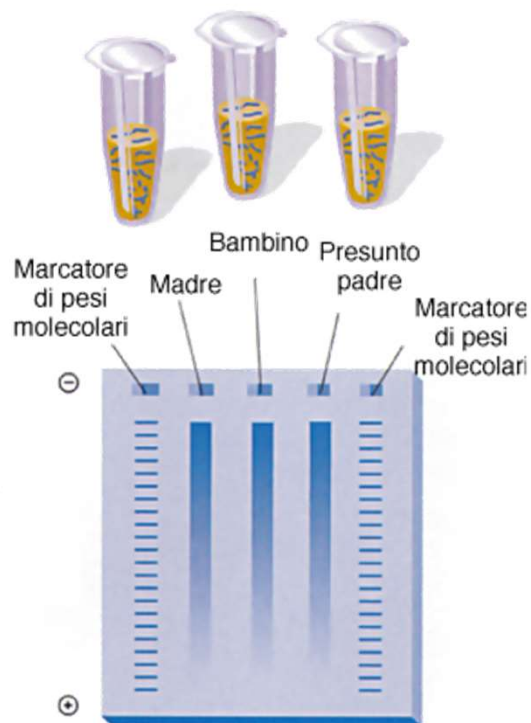
Saggi di ibridazione

Impronte di DNA (DNA fingerprinting): I satelliti



Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

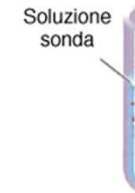
1 Il DNA è prelevato dalla madre, dal bambino e dal presunto padre. In analisi separate, il DNA è tagliato in frammenti con l'enzima di restrizione



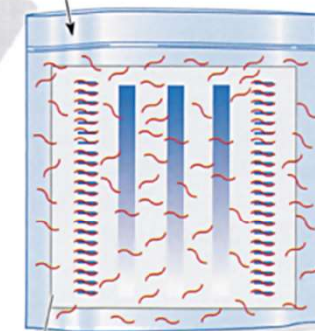
2 Elettroforesi su gel del DNA di ciascun campione e dei marcatori di pesi molecolari

Saggi di ibridazione

3 Preparato Southern blot dal gel



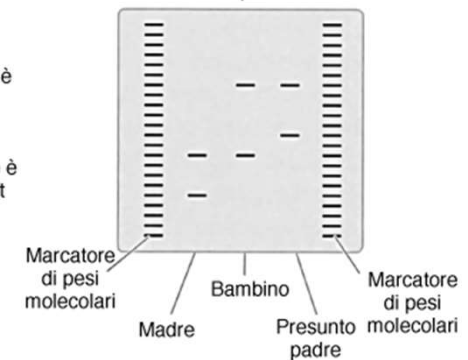
4 Il filtro viene incubato con una sonda di DNA radioattivo. La sonda di DNA si lega a specifiche sequenze del DNA sul filtro



5 L'eccesso di sonda è lavato via, lasciando la sonda radioattiva ibridata al filtro

Filtro con DNA legato

6 L'autoradiografia è preparata. La distribuzione delle bande per ciascun campione è un DNA fingerprint

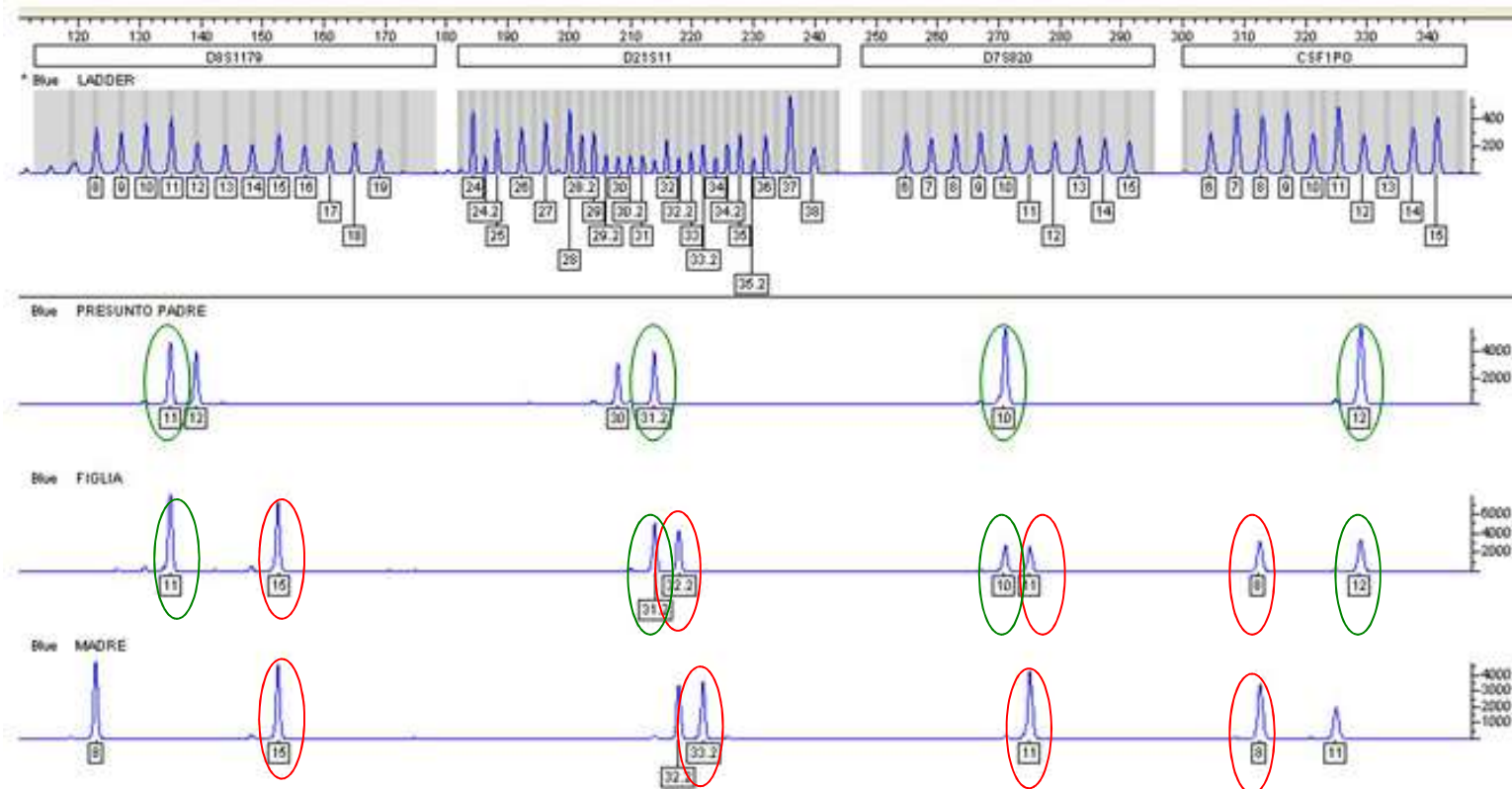


Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

PCR di STR

Amplificazione tramite PCR di STRs e analisi delle dimensioni

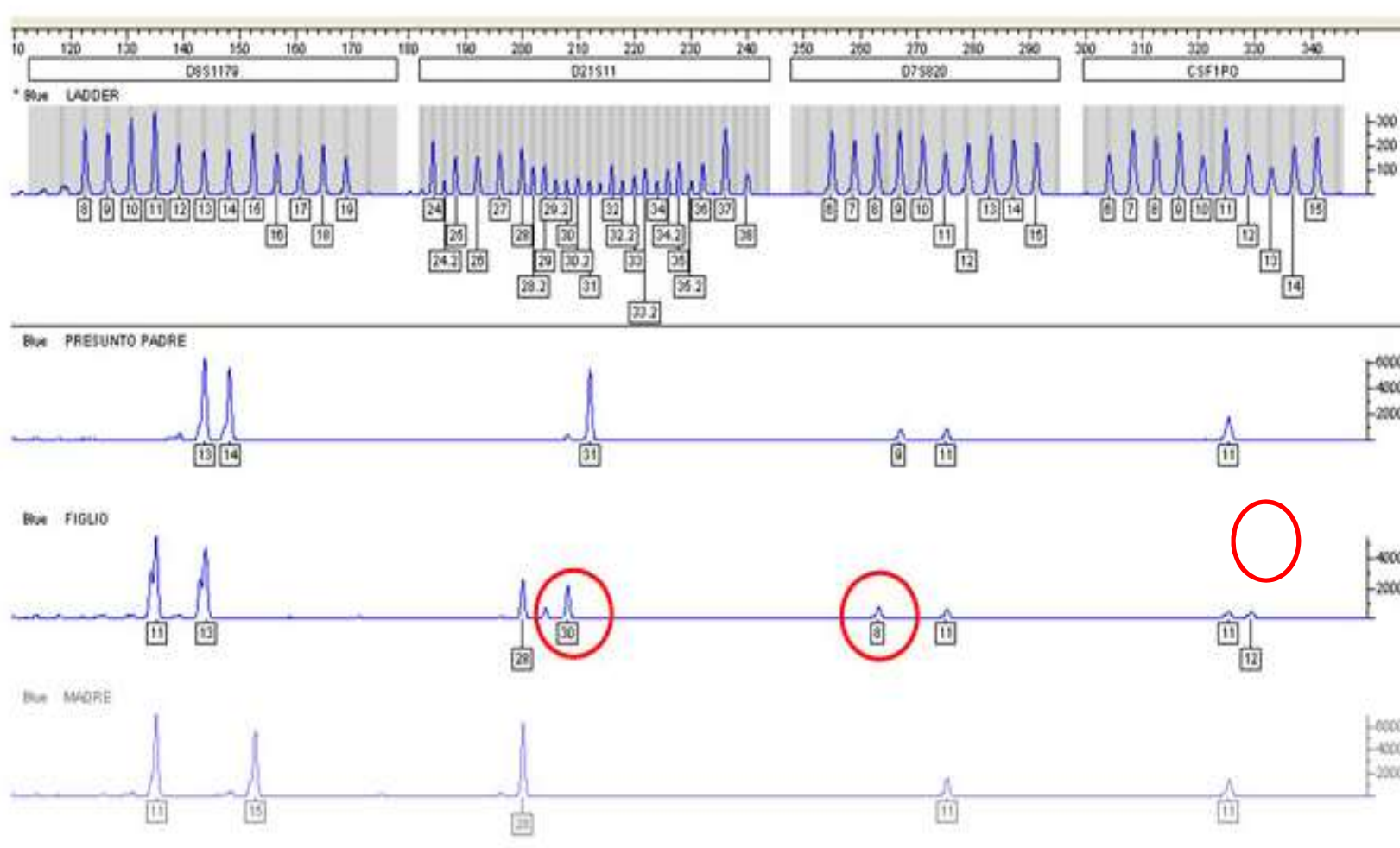
Attribuzione di paternità



Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

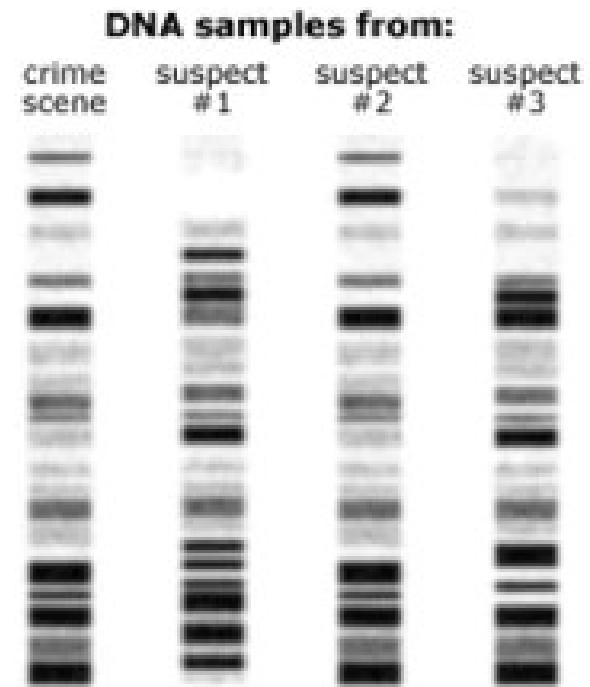
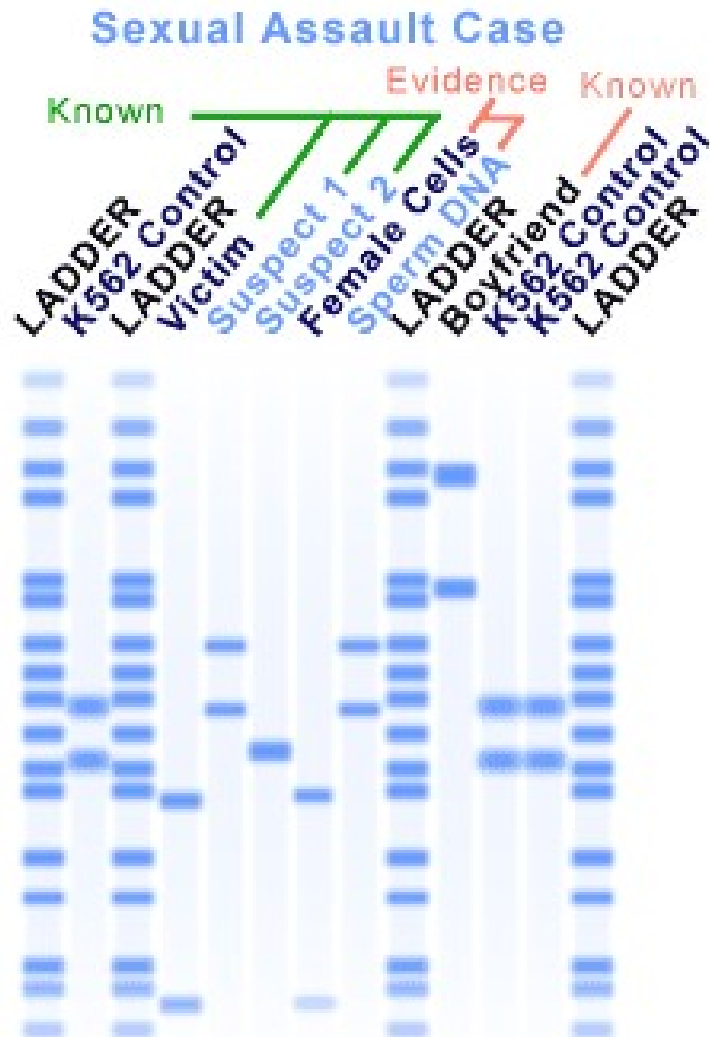
PCR di STR

Esclusione di paternità



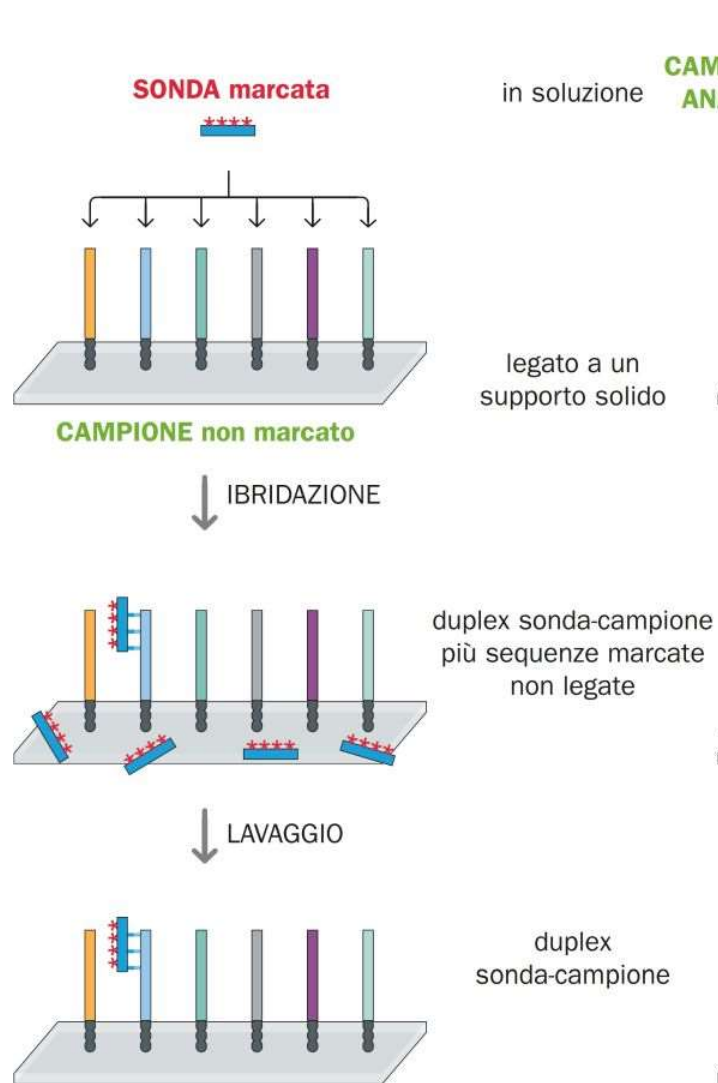
Tipizzazione del DNA per identificazione autore di delitto

Saggi di ibridazione

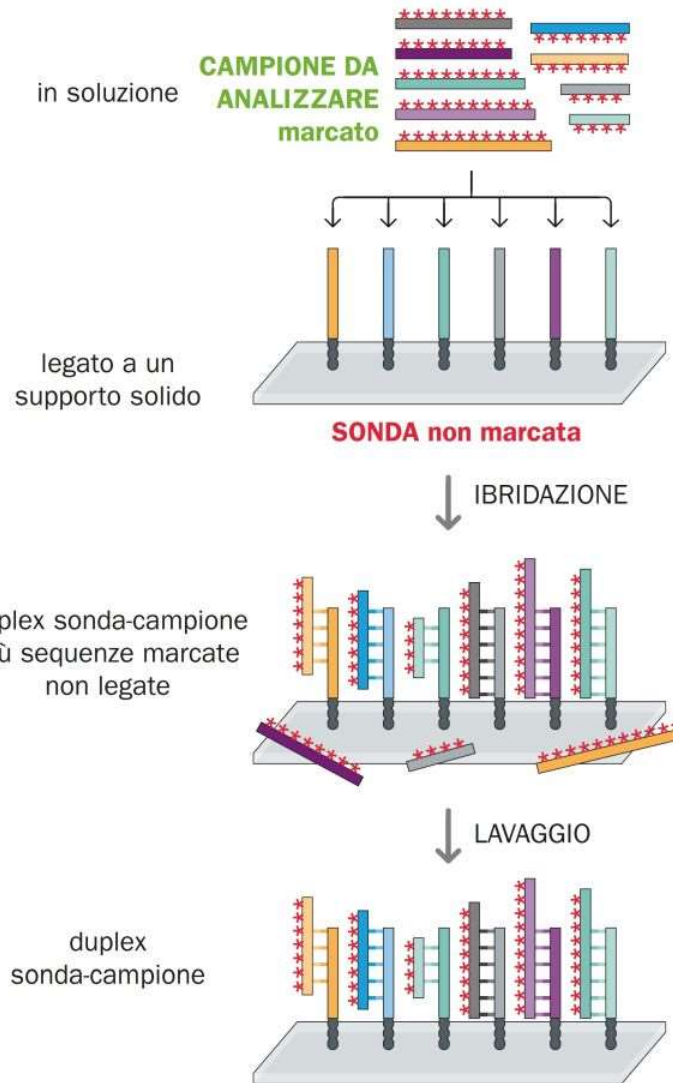


Saggi di ibridazione

SAGGIO STANDARD

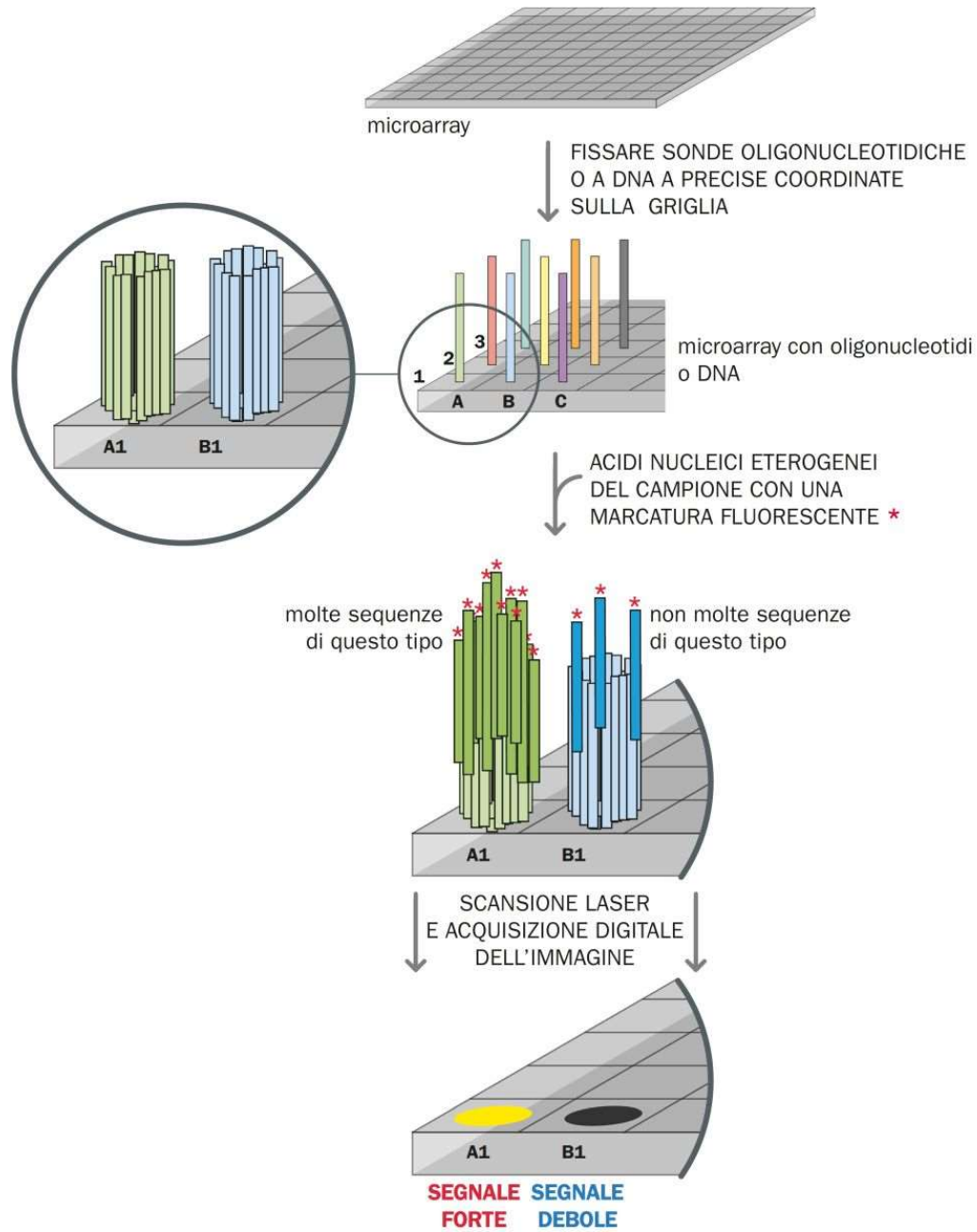


SAGGIO REVERSE

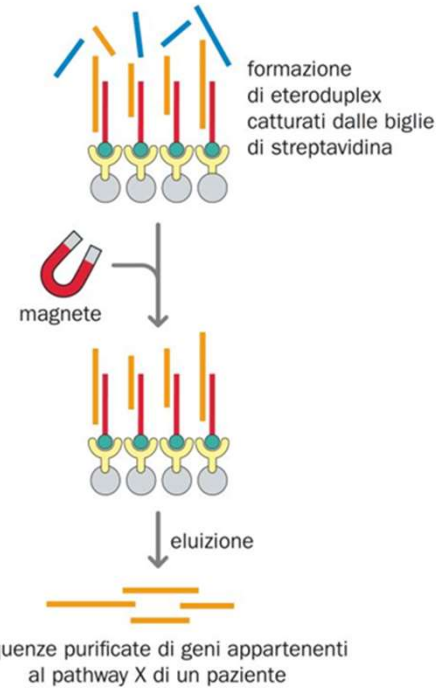
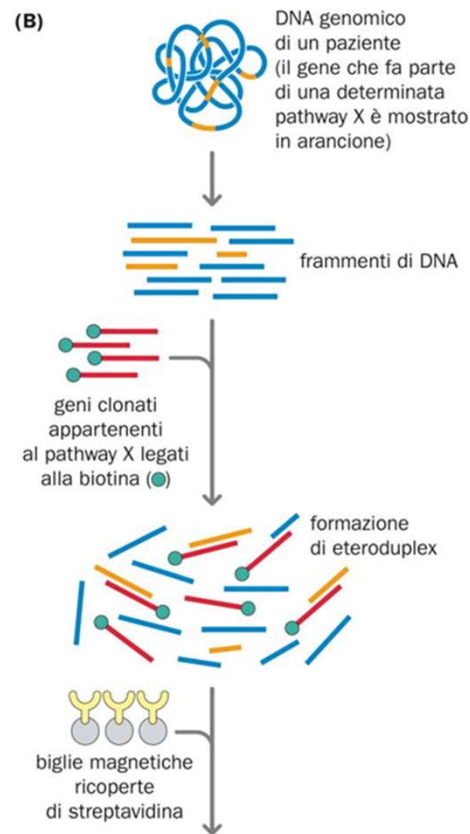
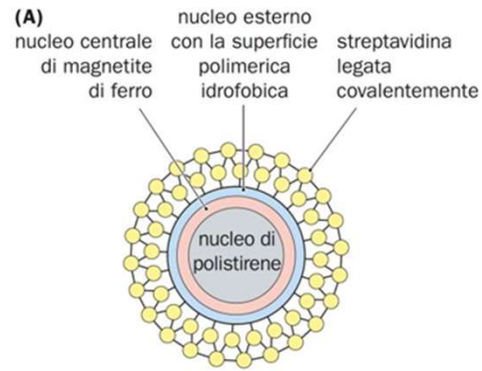


Saggi di ibridazione

I microarray



Saggi di purificazione

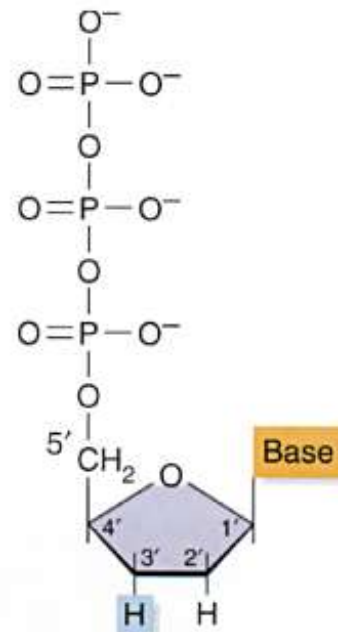


Amplificazione/Clonazione

Ibridazione/Sonda

Sequenziamento

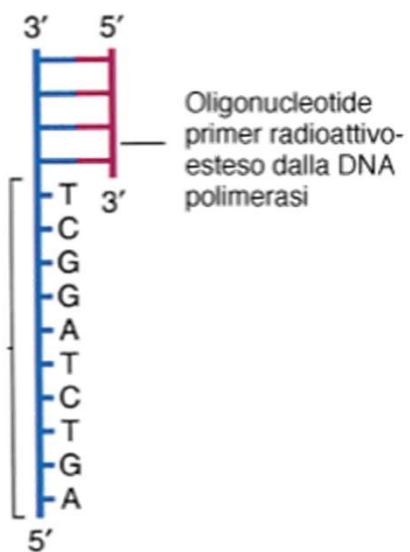
SEQUENZIAMENTO DEL DNA metodo dei didesossinucleotidi



Didesossinucleoside
trifosfato

(il normale precursore del
DNA ha OH in posizione 3')

Sequenza clonata da analizzare

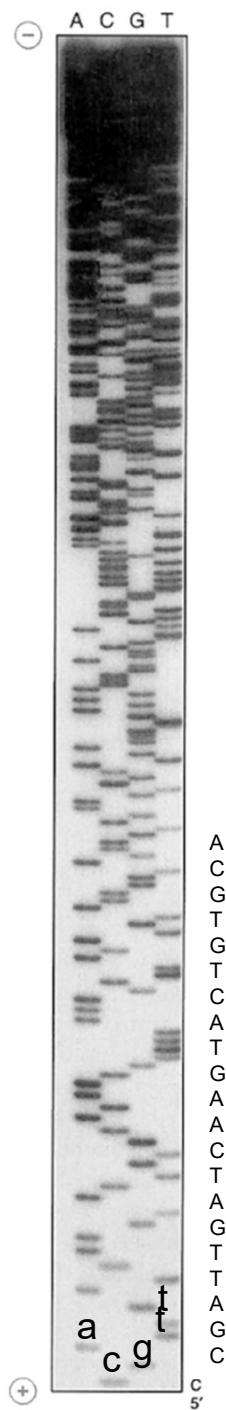


Reazione:

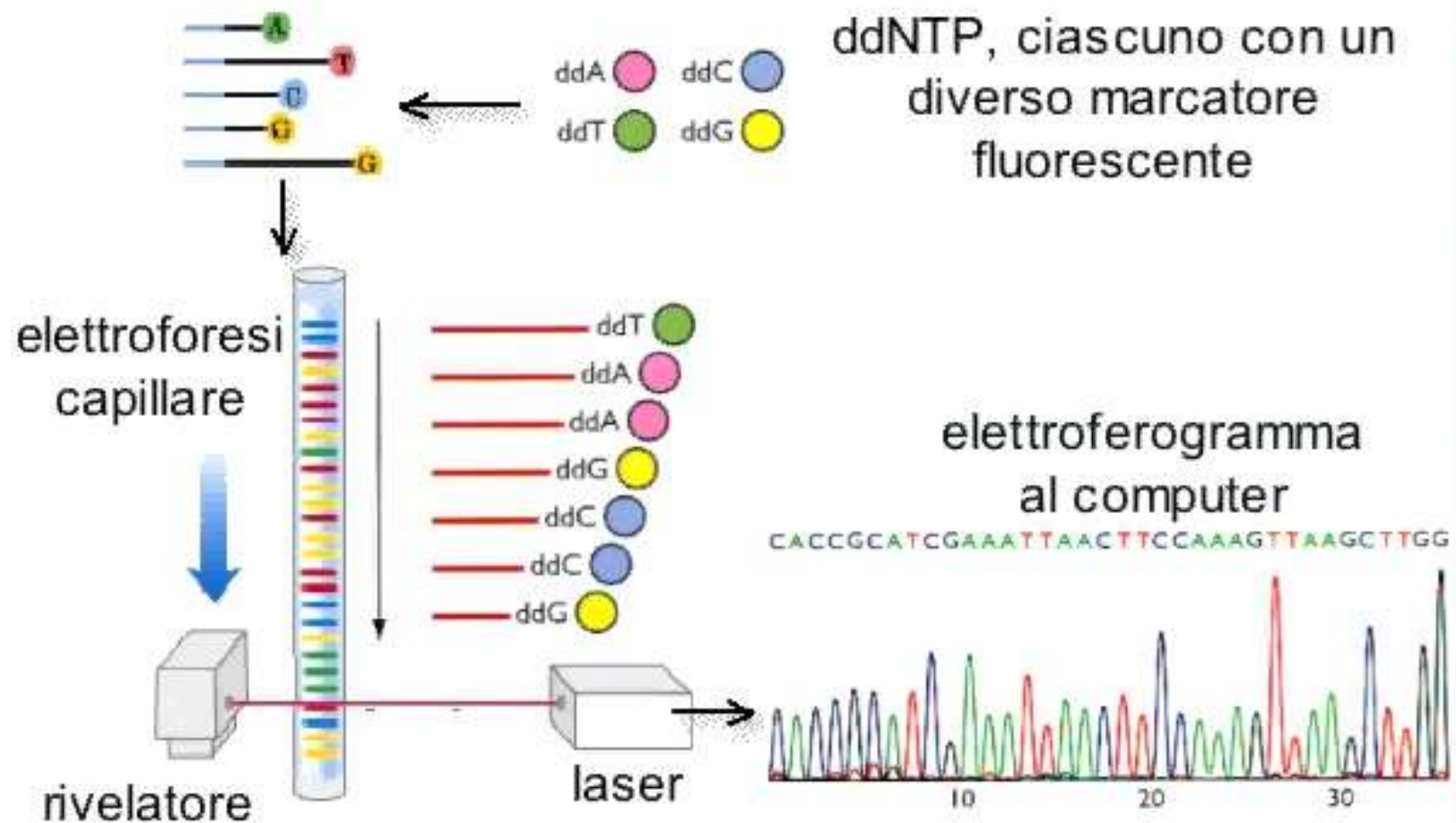
Prodotti di DNA:

	ddA	ddC	ddG	ddT
5'	A A A	A A A	A A	A A
	G G	G G G	G G	G G
	C C	C C C	C	C C
	C C	C	C	C C
	T T	T	T	T
	A A	A	A	A
	G	G	G	G
	A	A		A
		C		C
3'				T

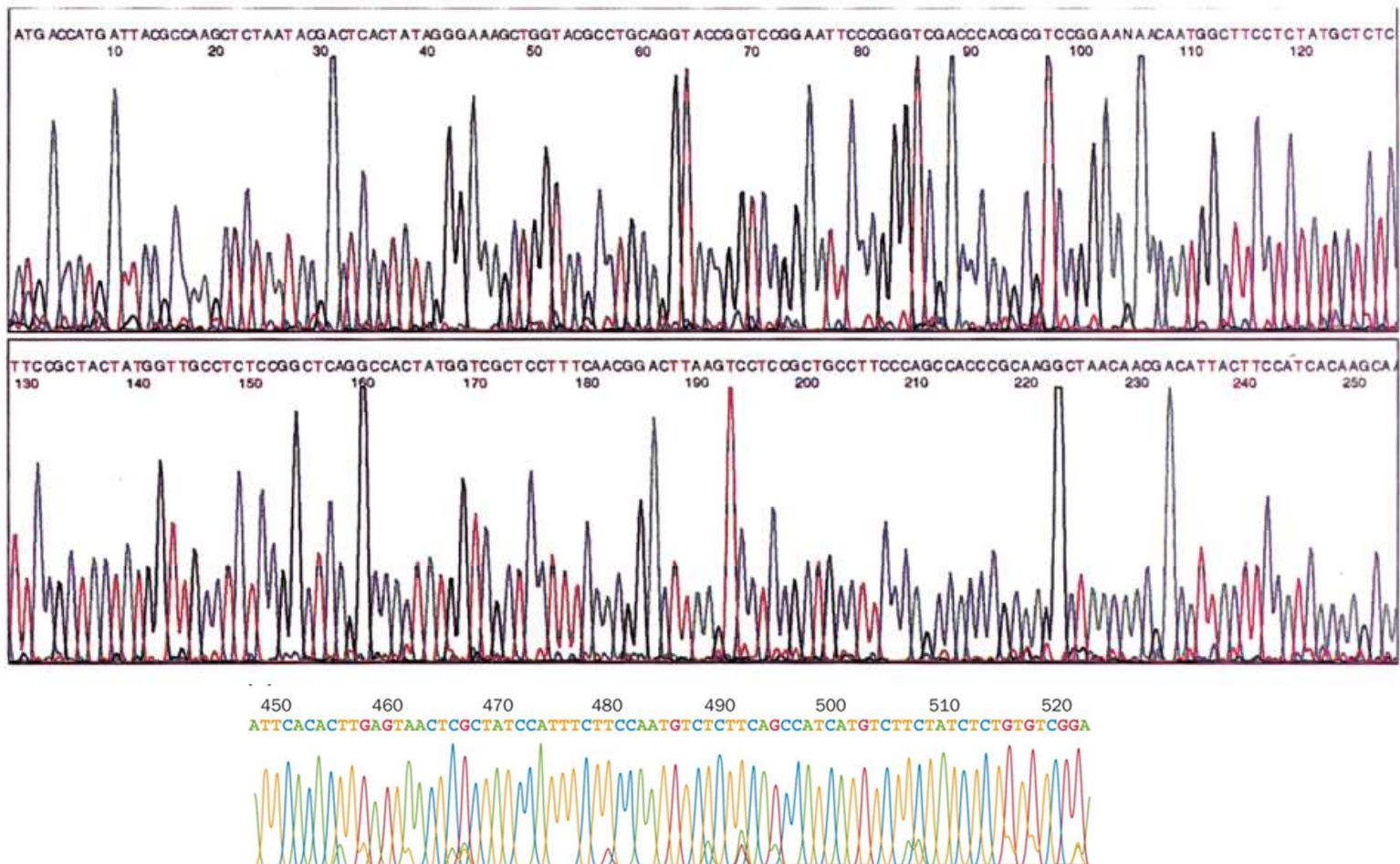
Sequenziamento



Sequenziatori a fluorescenza



Sequenziamento automatico del DNA con marcatori fluorescenti



Next Generation Sequencing (NGS)

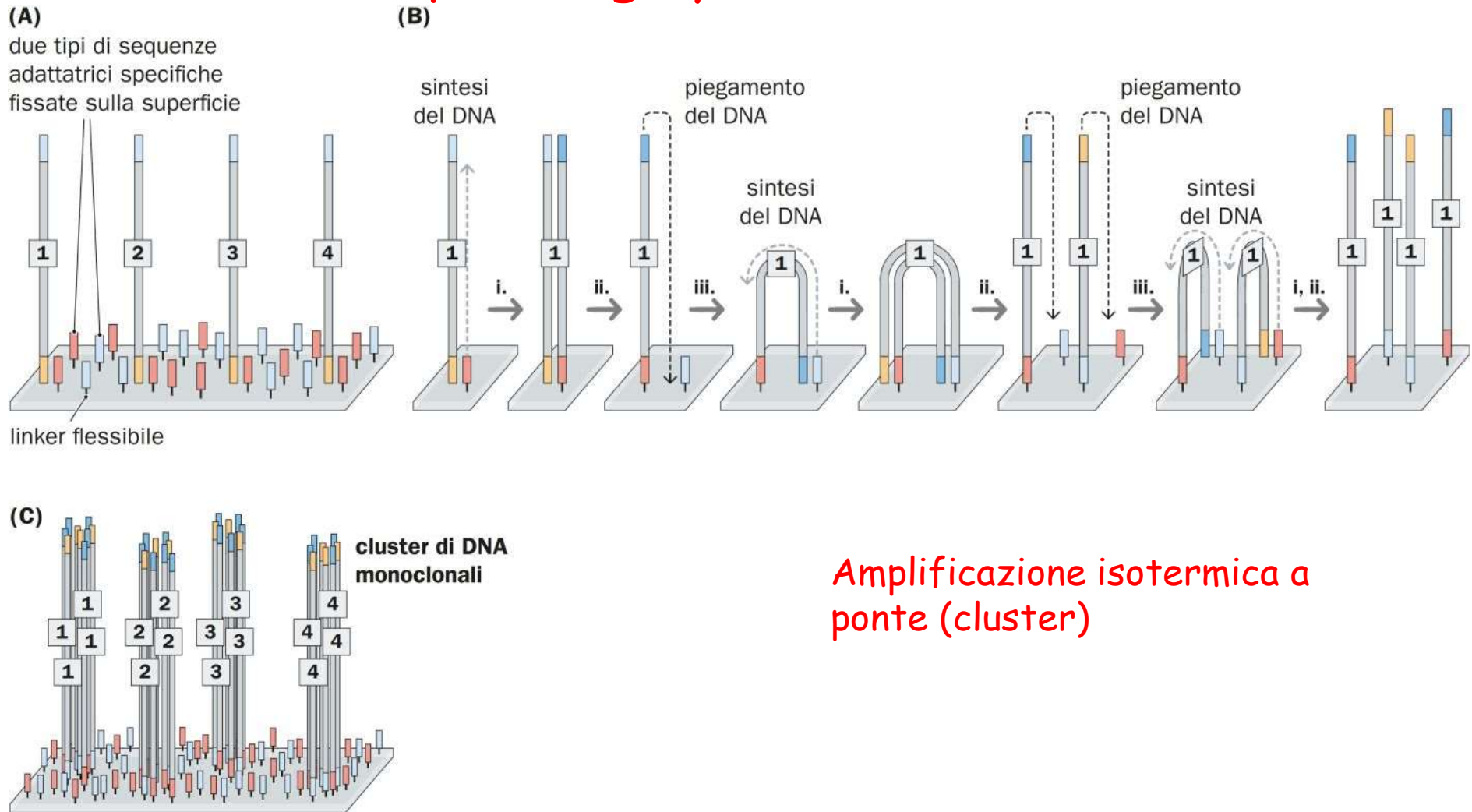
Sequenziamento contemporaneo di un grande numero di frammenti di DNA diversi.

Possibilità di sequenziare velocemente interi genomi e interi trascrittomi.

Possibilità di sequenziare e quindi identificare tutte le porzioni del genoma occupate da specifici fattori trascrizionali o da specifiche modifiche epigenetiche (ChIPseq)

Next Generation Sequencing (NGS)

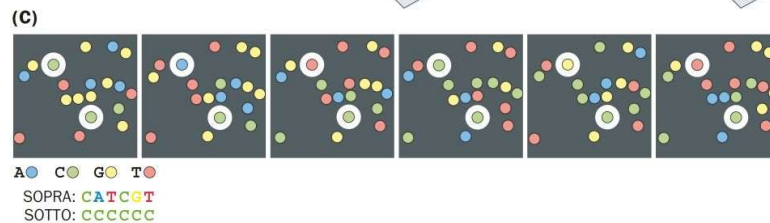
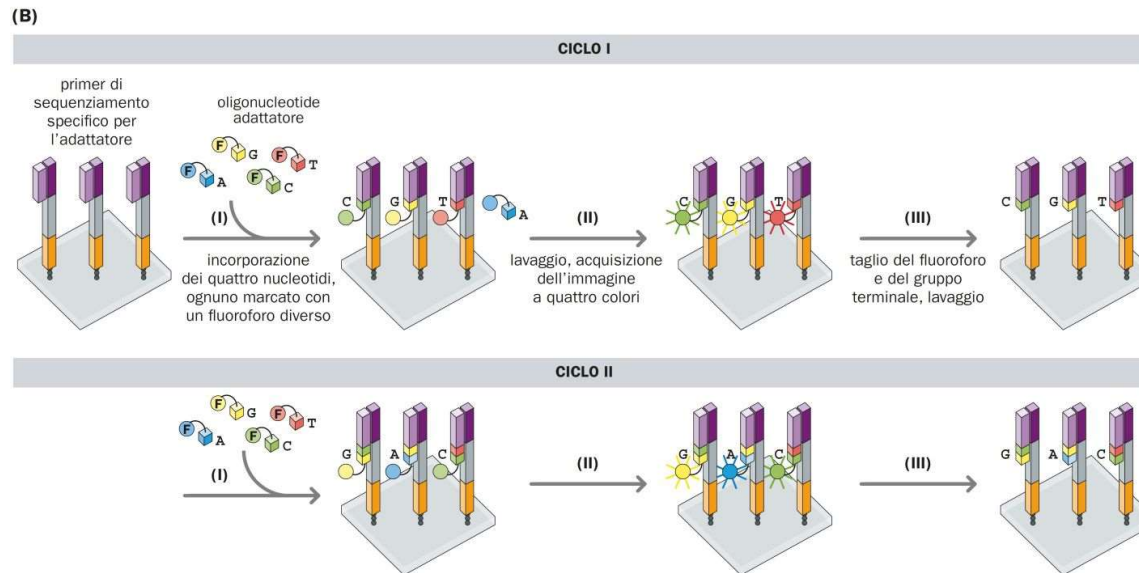
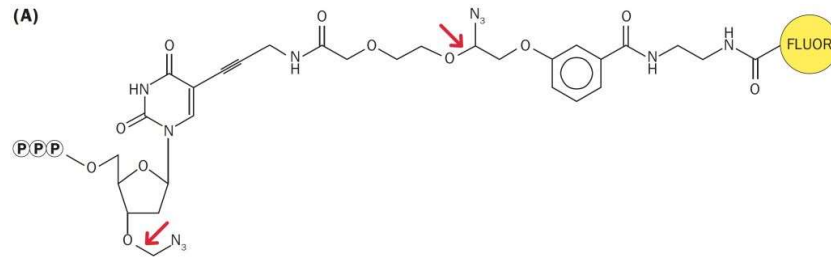
Illumina sequencing system



Amplificazione isoterma a ponte (cluster)

Next Generation Sequencing (NGS)

Illumina sequencing system



Next Generation Sequencing (NGS)

Illumina sequencing system

Studio dell'espressione genica

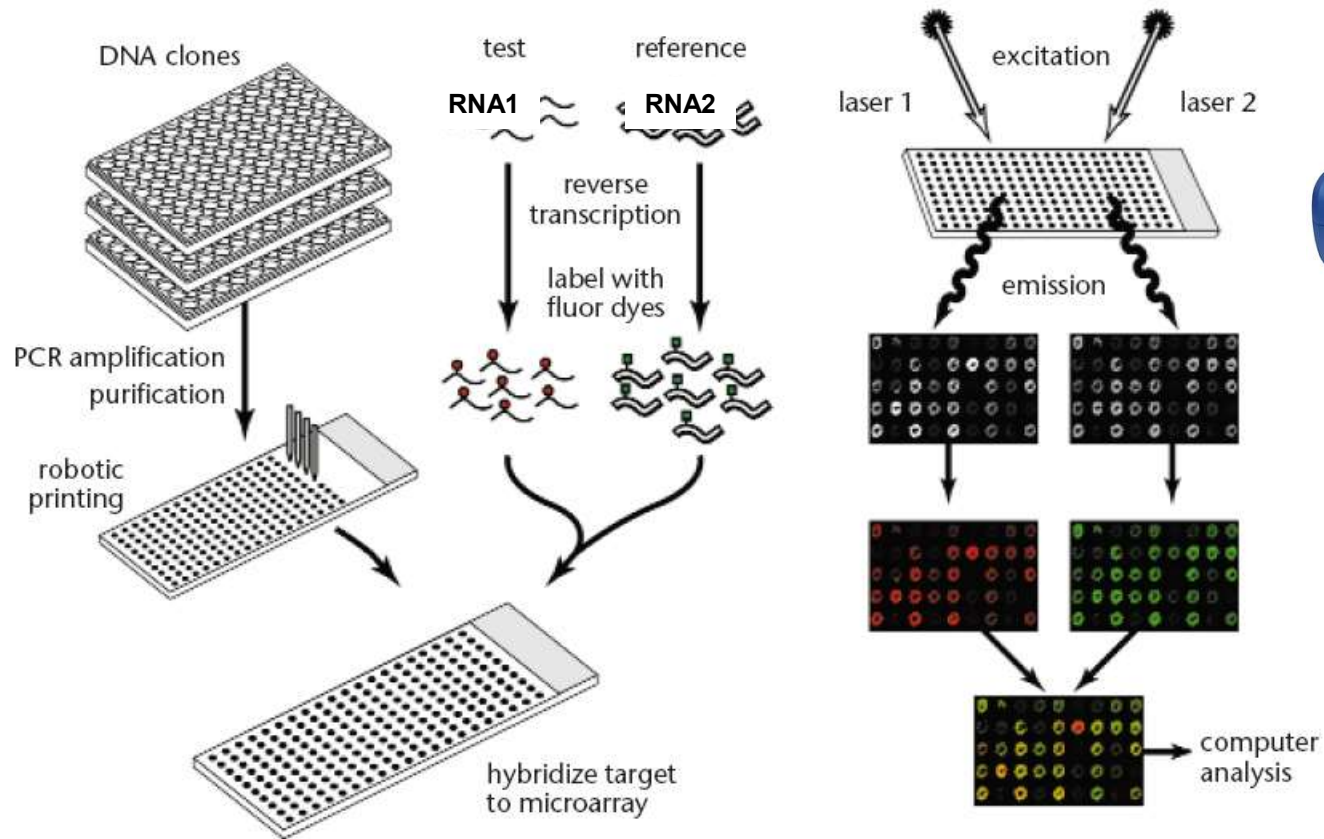
-Northern Blotting

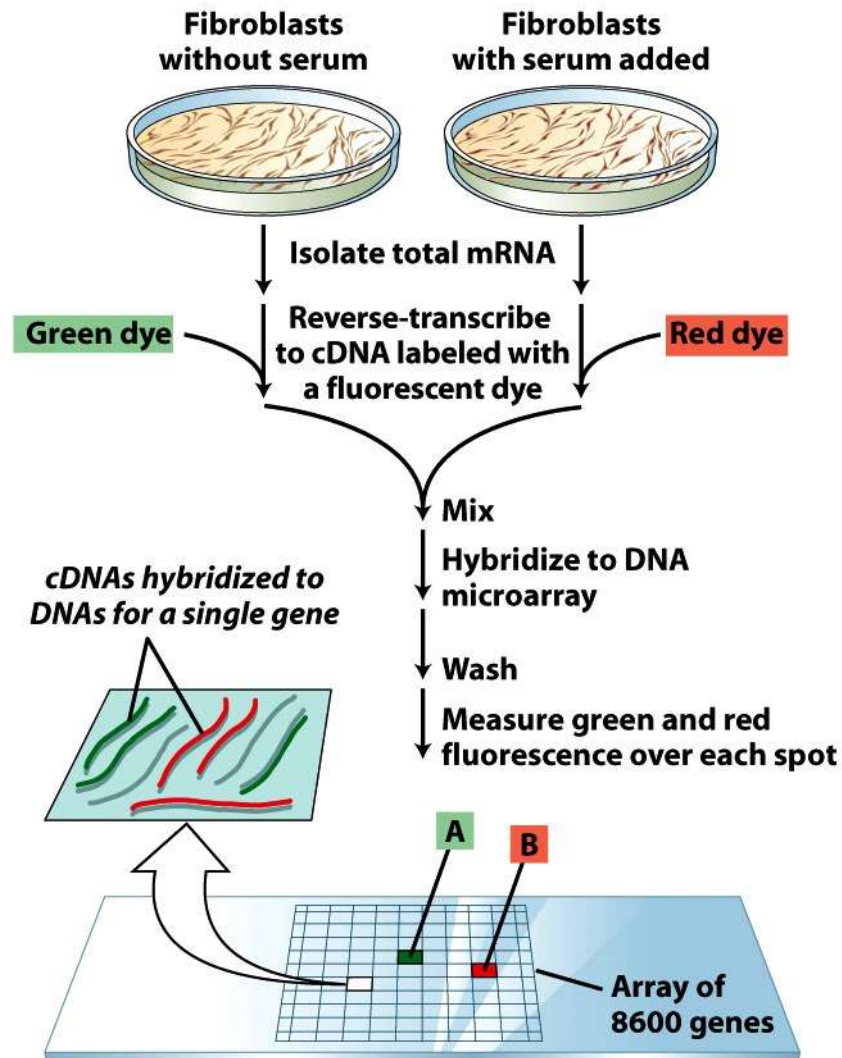
-Reverse Transcriptase-PCR

-Western blotting

-MicroArray trascrizionale

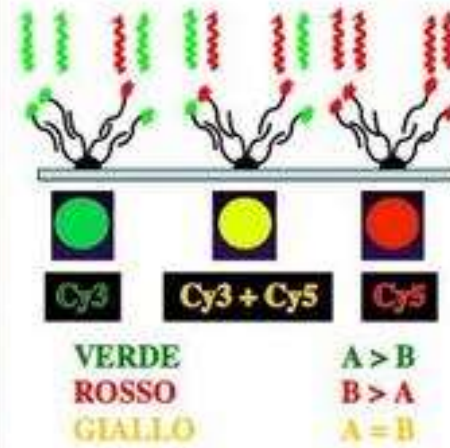
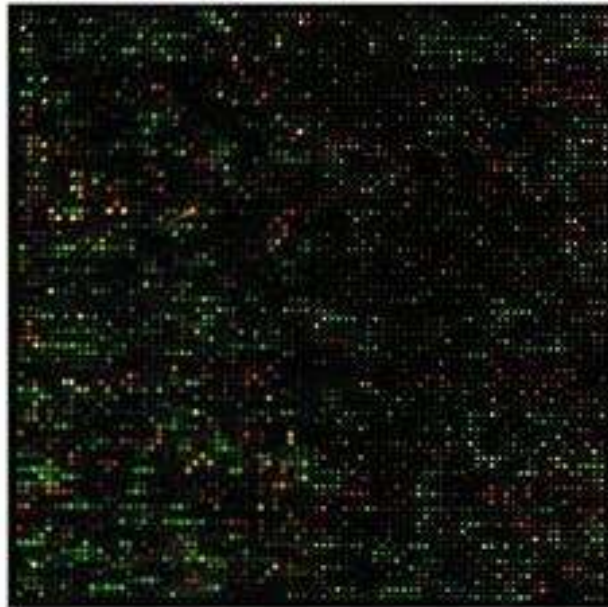
Microarray

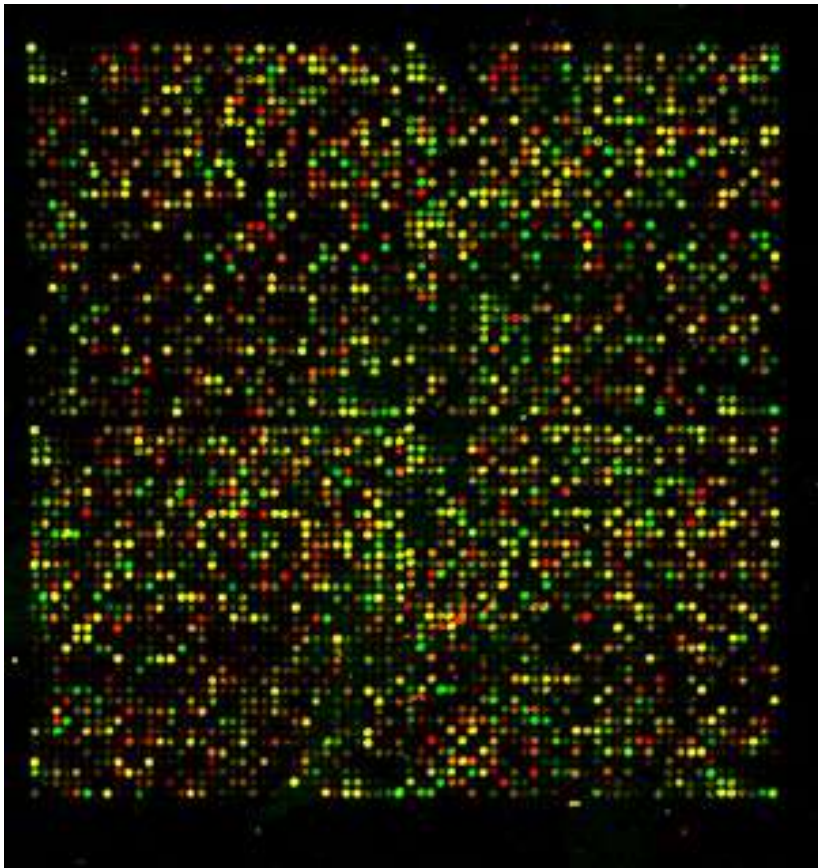




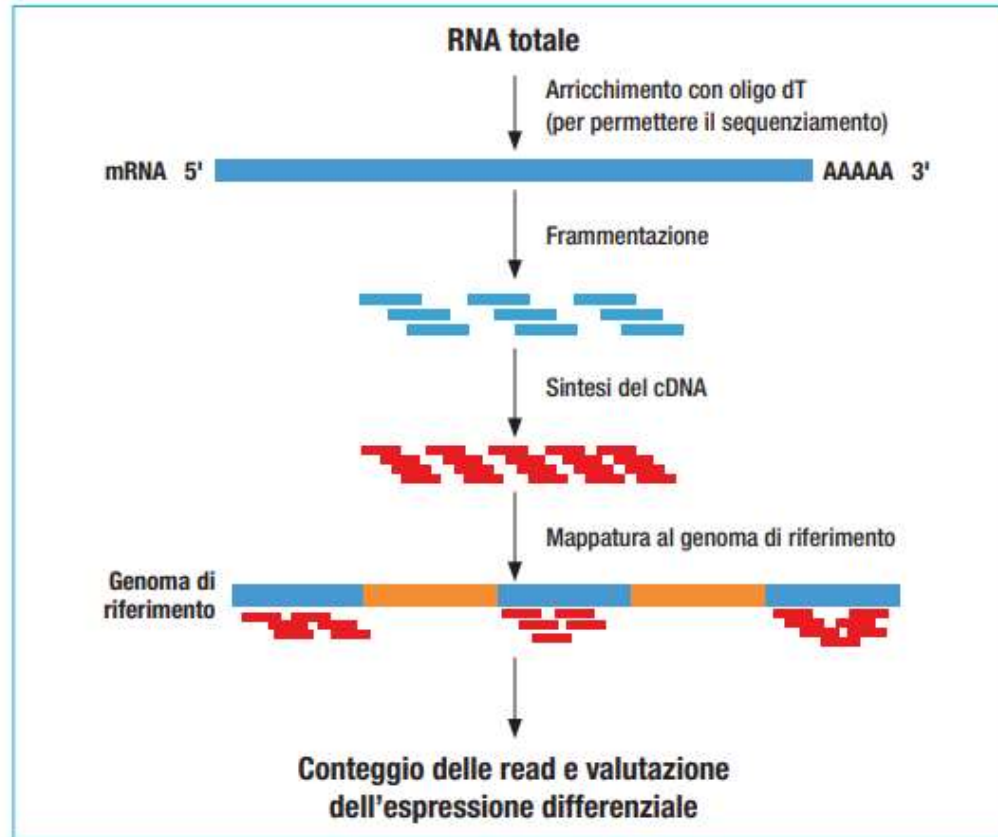
- A** If a spot is green, expression of that gene decreases in cells after serum addition
- B** If a spot is red, expression of that gene increases in cells after serum addition

Figure 5-29a
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company





RNAseq

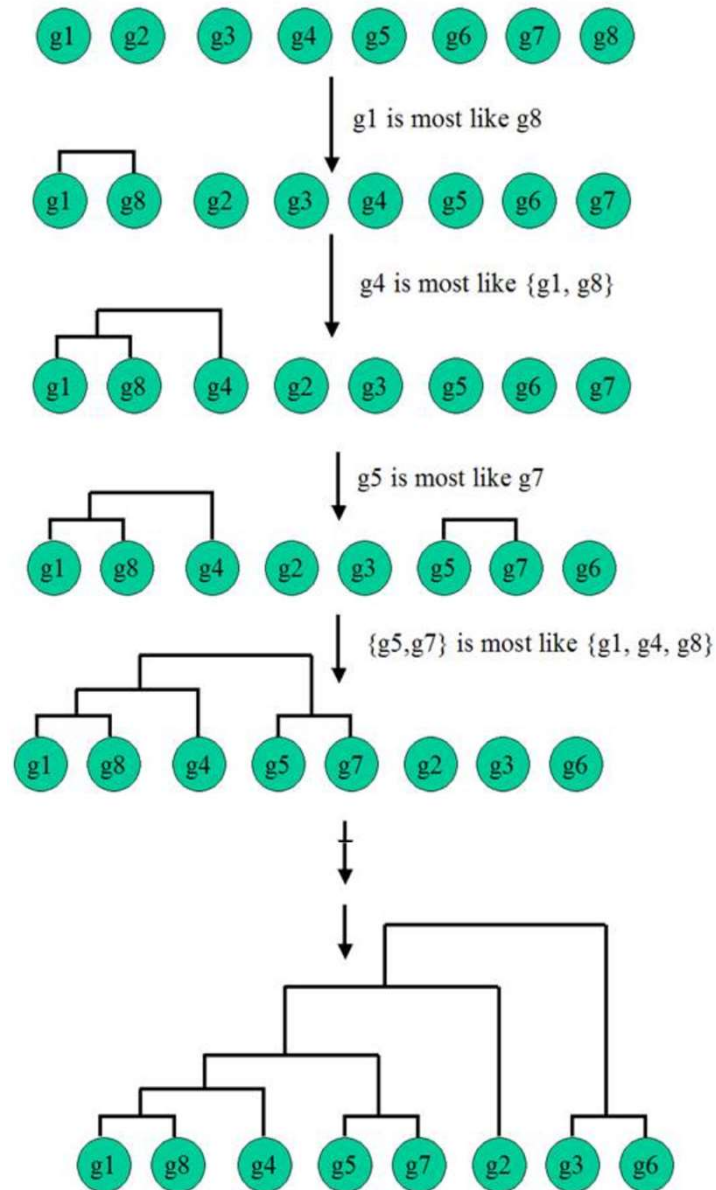


L'RNA-Seq è una tecnica per l'analisi del trascrittoma e la sua quantificazione basata sulle tecnologie di Next-Generation Sequencing. I sequenziatori forniscono una valutazione dell'espressione genica attraverso le **READS**, ovvero le sequenze che identificano l'ordine in cui si susseguono le basi azotate che compongono il gene; il numero di read per ciascun gene (mappato su genoma o trascrittoma di riferimento) viene detto **COUNT** e costituisce una misura dell'espressione genica. Nella figura le read vengono visualizzate come frammenti rossi allineati al genoma di riferimento.

Clustering Analysis

Raggruppamento di geni che hanno un livello di espressione simile

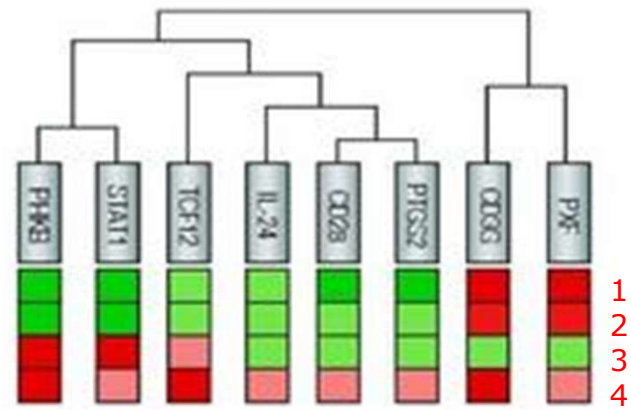
Hierarchical Clustering



Il ***clustering gerarchico*** utilizza la matrice delle distanze per costruire ***clusters*** (gruppi di geni con profili di espressione simili)



Raggruppamento di geni con profili di espressione simili (valutati in quattro diverse linee cellulari)

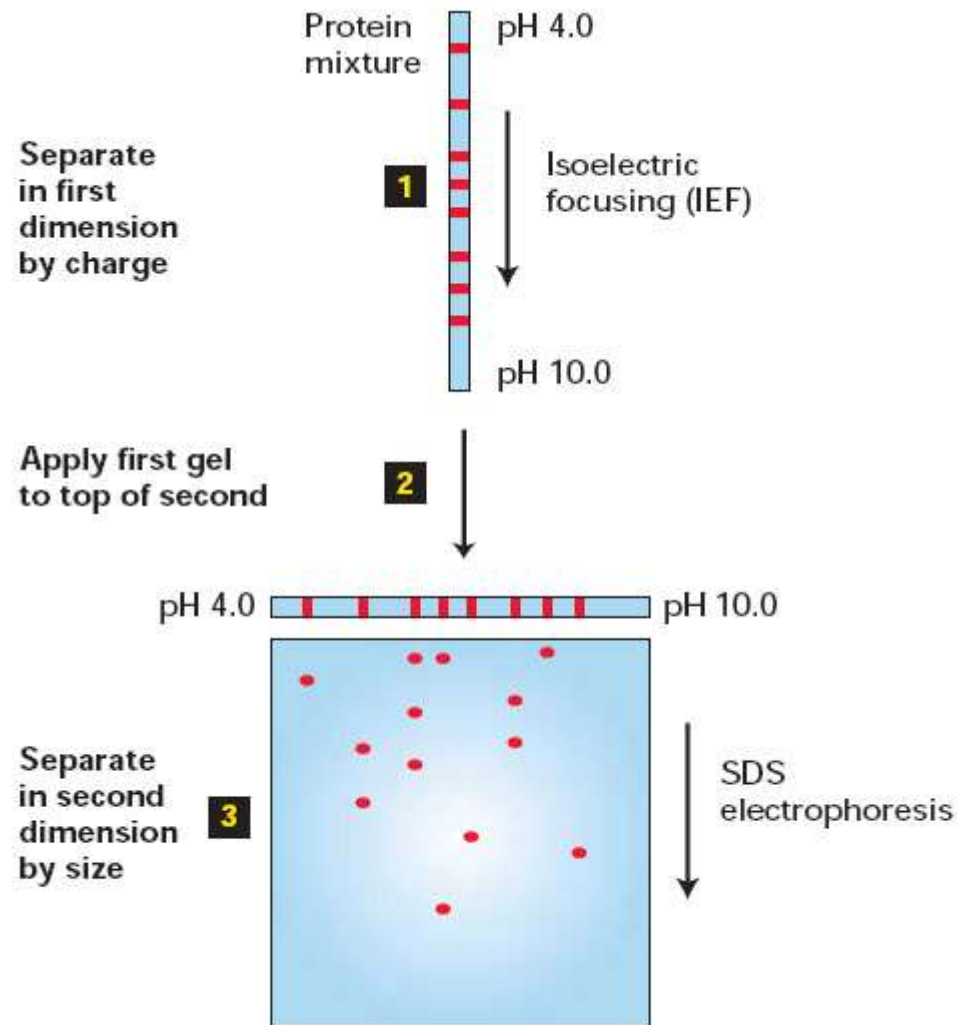


Linee cellulari

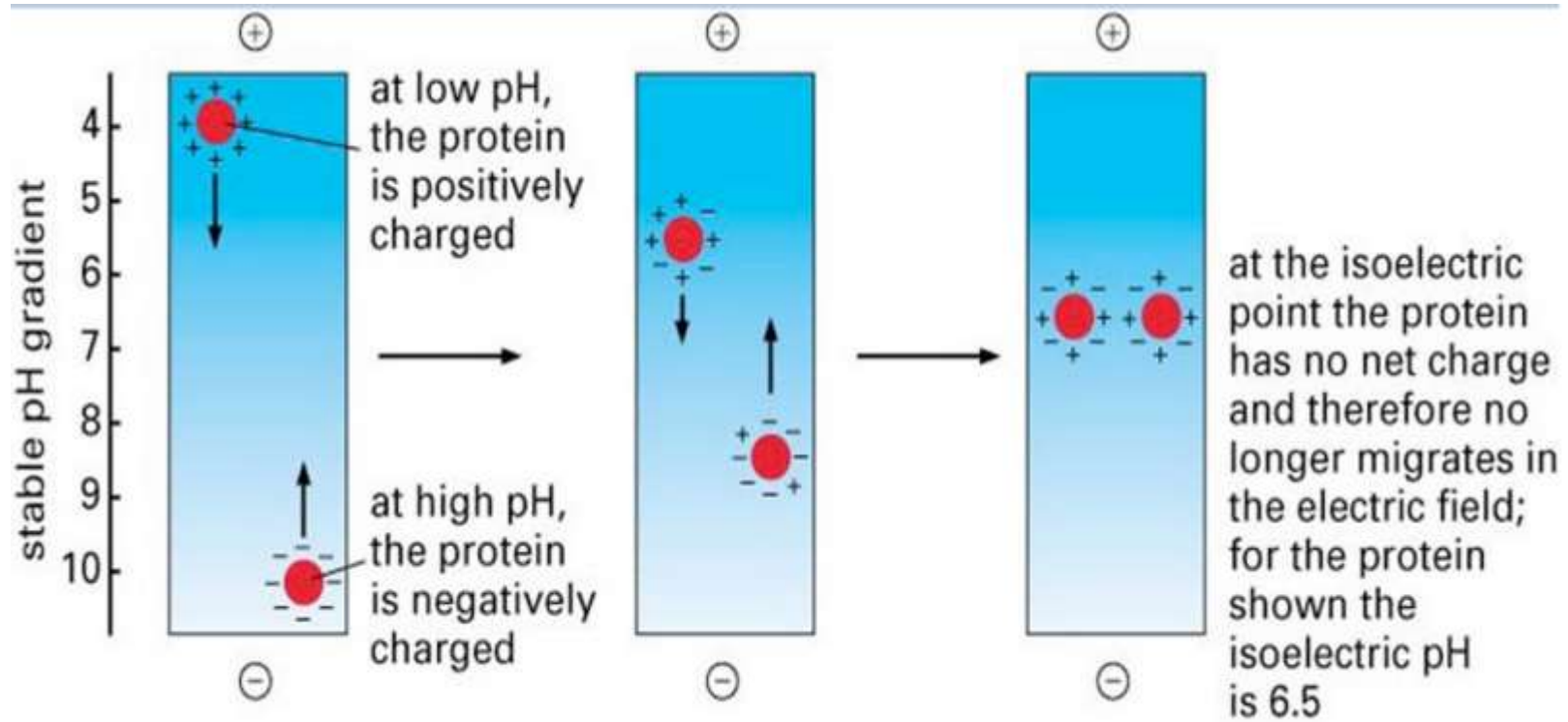
Proteomica
Elettroforesi bidimensionale-Spettrometria di massa

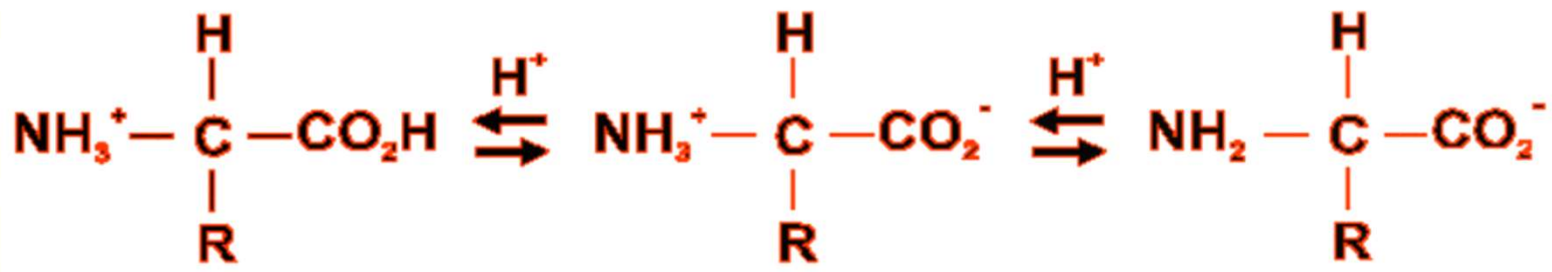
Elettroforesi Bidimensionale

Le proteine sono separate per carica (gradiente di pH) e per grandezza.



Isolettrofocalizzazione





Carica positiva

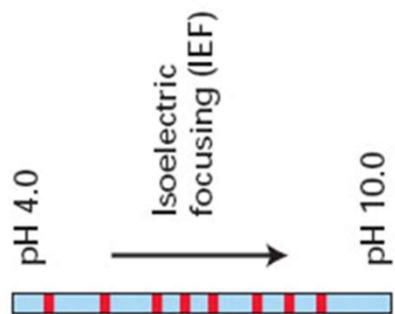
Carica nulla

Carica negativa

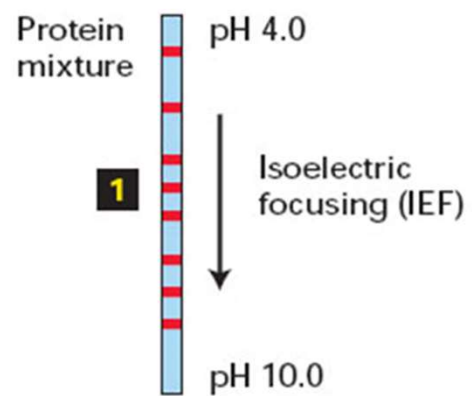
pH acido
alta [H⁺]

pI

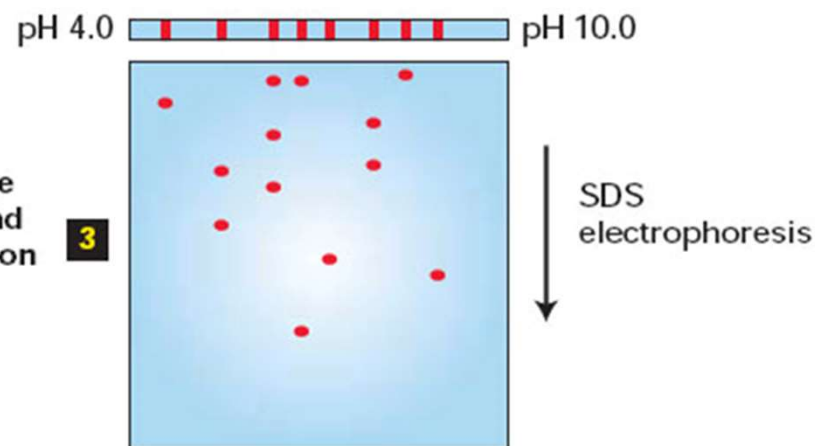
pH basico
bassa [H⁺]



Separate
in first
dimension
by charge

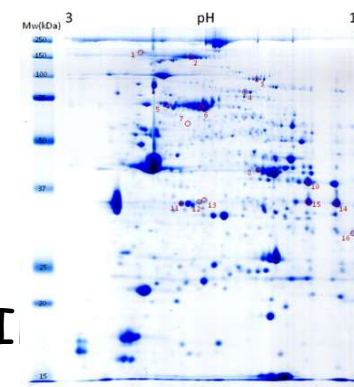


Separate
in second
dimension
by size

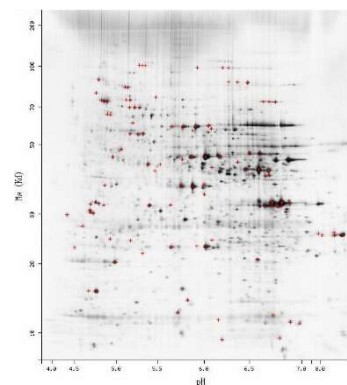


Colorazione del gel elettroforetico

1. **Coomassie staining** da 50- a 100-volte meno sensibile della colorazione argento ma relativamente semplice e più quantitativo. Il blu di Coomassie è migliore per la spettrometria di massa perché la colorazione argentea è incompatibile.



2. **Silver staining** è il metodo non-radioattivo più sensibile (sotto 1 ng). Si tratta però di un processo multi-step complesso che ha alcuni passaggi critici.

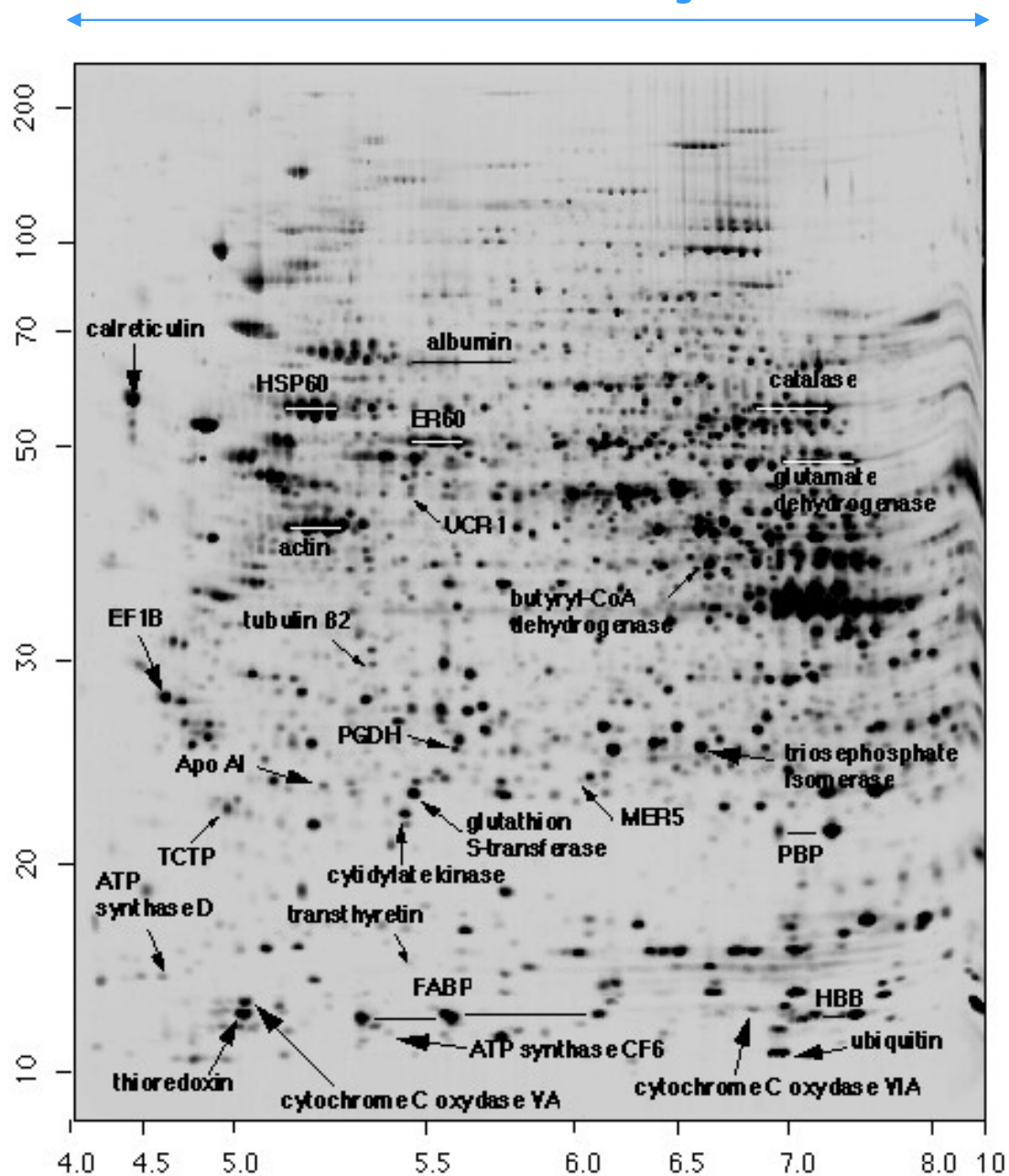


3. **Fluorescent staining SYPRO™** ha una sensibilità intermedia fra le due colorazioni precedenti. Richiede l'utilizzo di uno scanner per fluorescenza ed è compatibile con la spettrometria di massa.

Ogni macchia corrisponde ad una proteina



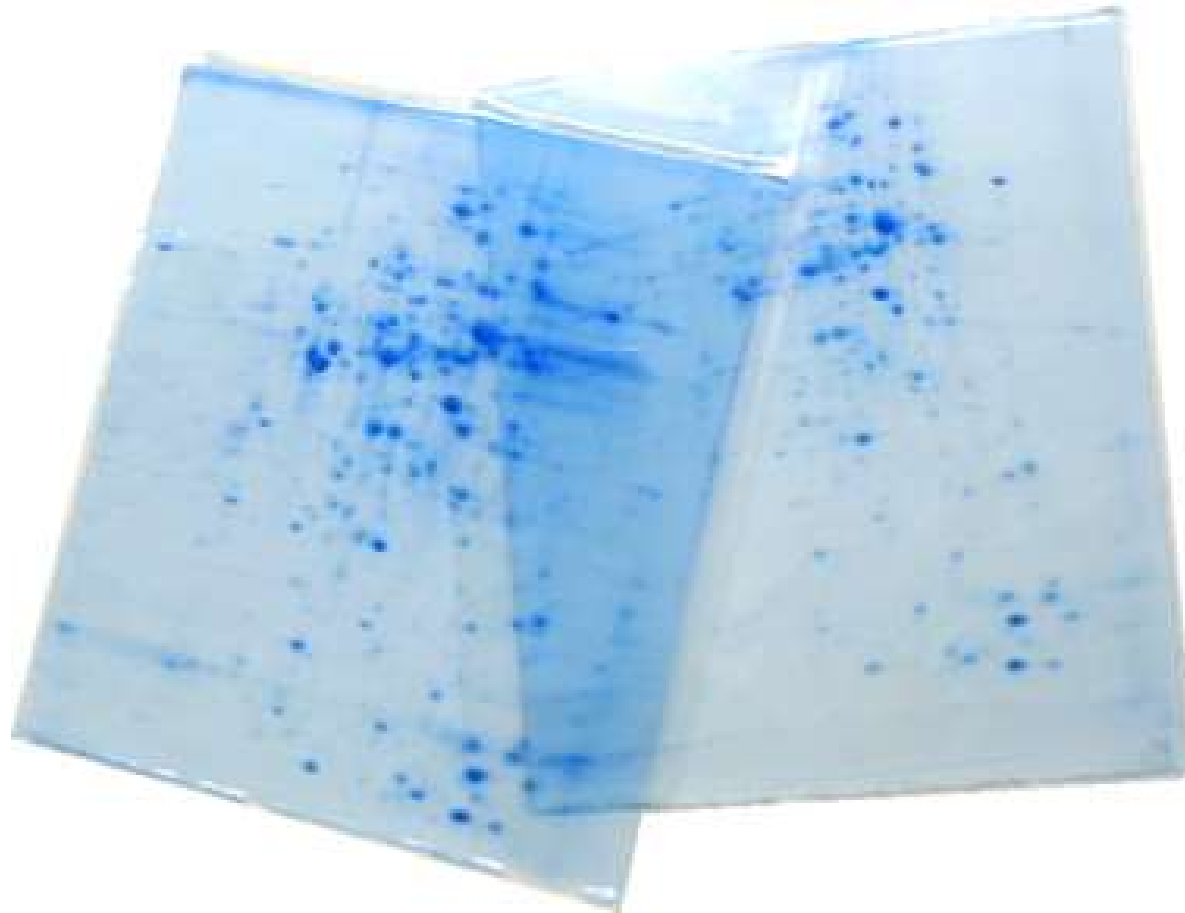
Isoelectric focusing



SDS-PAGE

Proteoma di
fegato adulto

Analisi comparativa di estratti proteici



Identificazione di una proteina tramite spettrometria di massa

Metodo:
matrix-assisted laser desorption ionization time of flight
(MALDI-TOF)

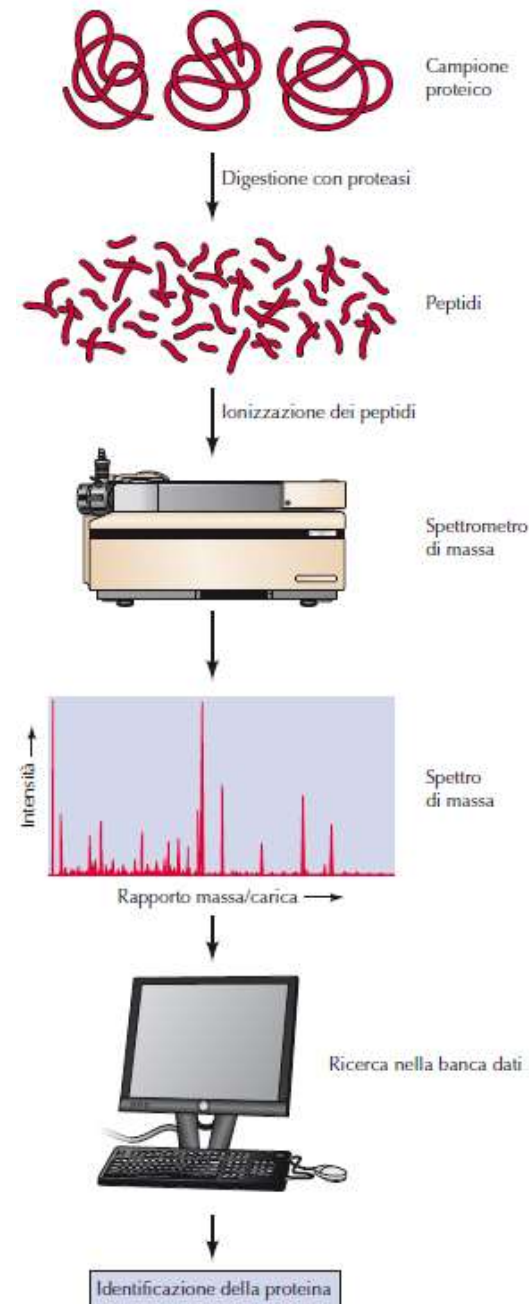
-Una macchia ritagliata dal gel è digerita da una proteasi in piccoli peptidi.

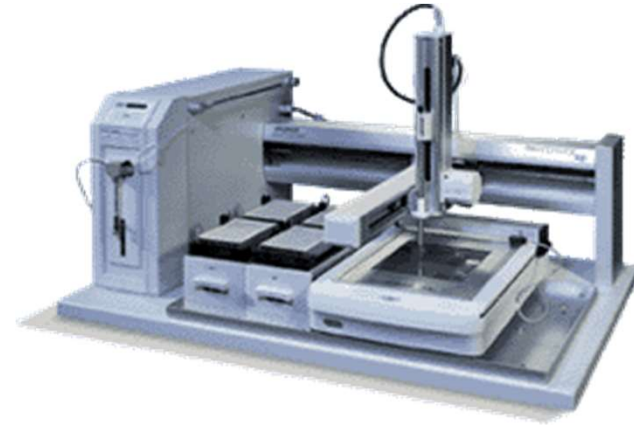
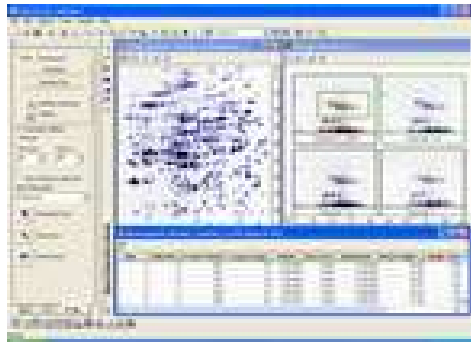
-I peptidi vengono sottoposti ad una alta carica che li ionizza e li rende volatili.

- La proteina ridotta a peptidi e ionizzata viene accelerata da un campo elettrico (20.000V) e lanciata in un tubo di volo (TOF).

-La velocità di volo dipende dalla massa e caratterizza ogni peptide.

-Uno spettro di massa sarà confrontato con spettri teorici di un data base e la proteina potrà essere identificata.





Digestione proteolitica "in gel" della proteina

Massa (peso molecolare)= identita' della proteina? No!



Peptide mass fingerprint

Proteolytic enzymes

Chymotrypsin

Trypsin

Lys-C protease

Arg-C protease

Cleavage specificity

Phe and Try

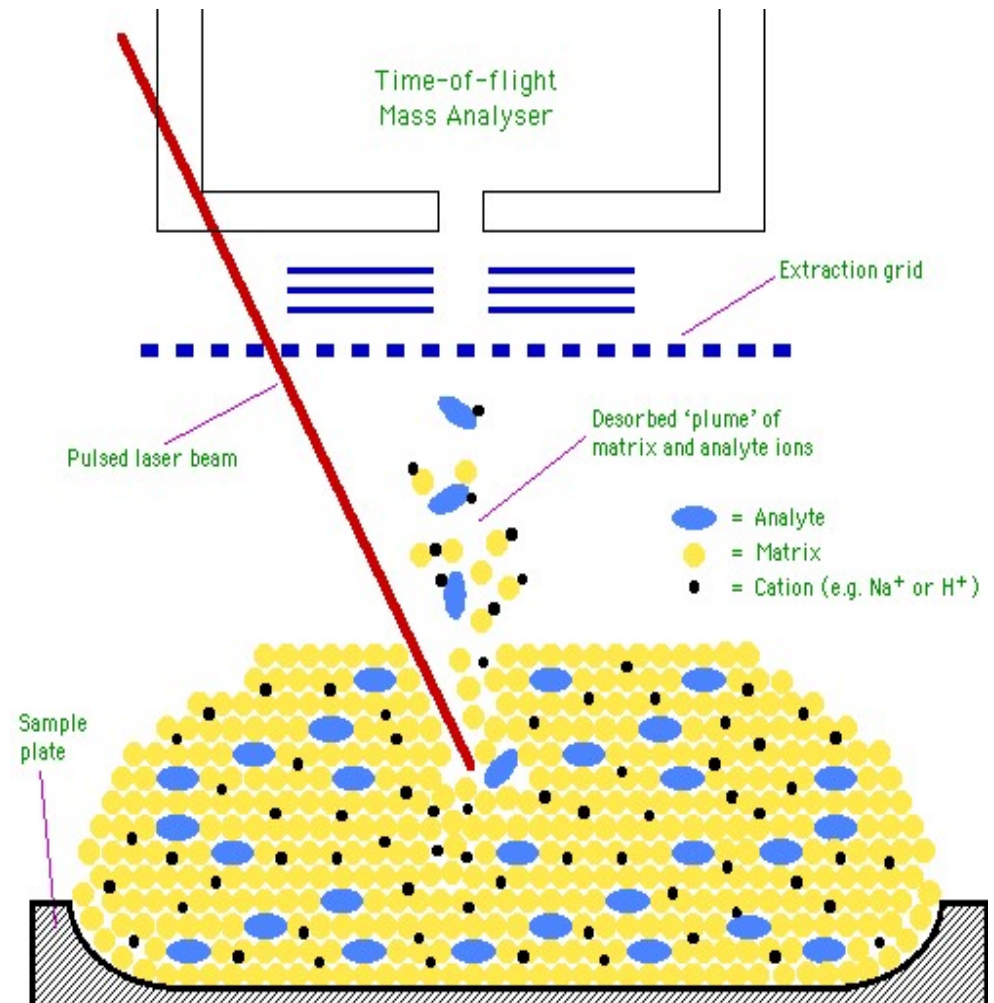
Arg and Lys

Lys

Arg

L'energia del laser colpendo la matrice ne provoca la rapida eccitazione con conseguente passaggio degli ioni della matrice e dell' analita in fase gassosa.

La proteina ionizzata viene accelerata da un campo elettrostatico (20.000V) e espulsa in un tubo di volo (TOF)



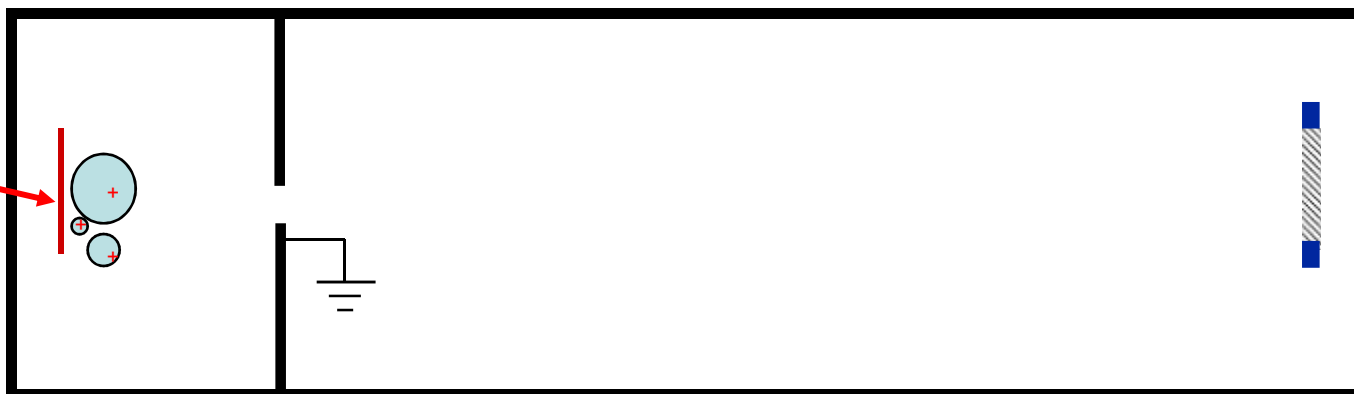
Time-of-Flight Mass Analyzer

Ion Source

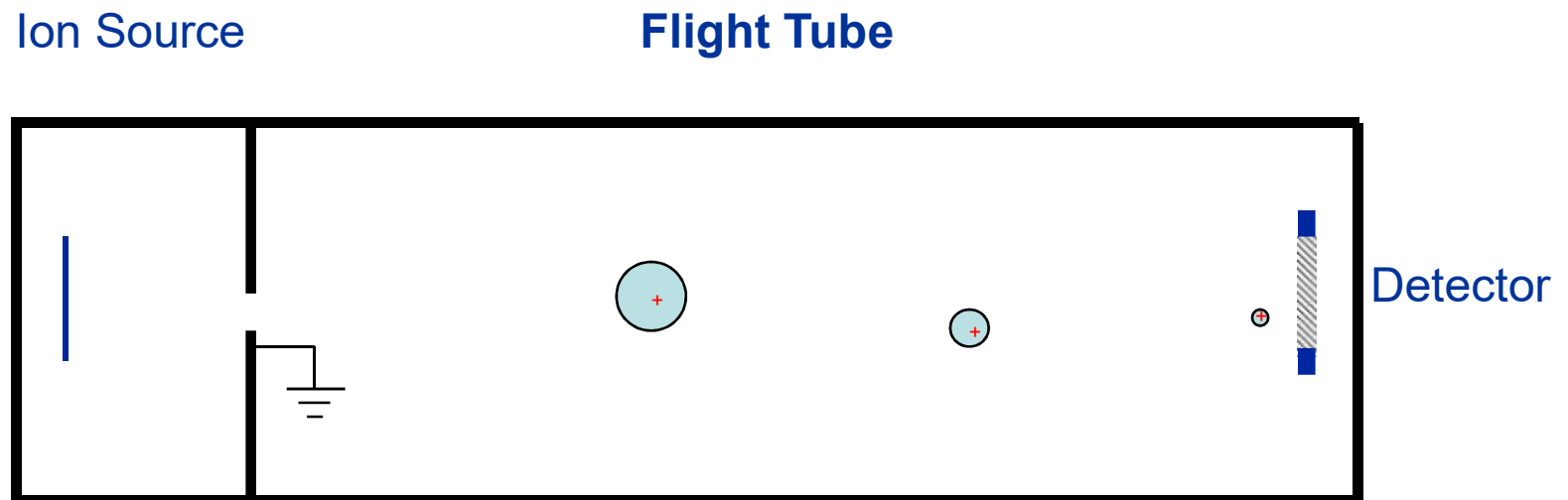
Flight Tube

Detector

+20 kV

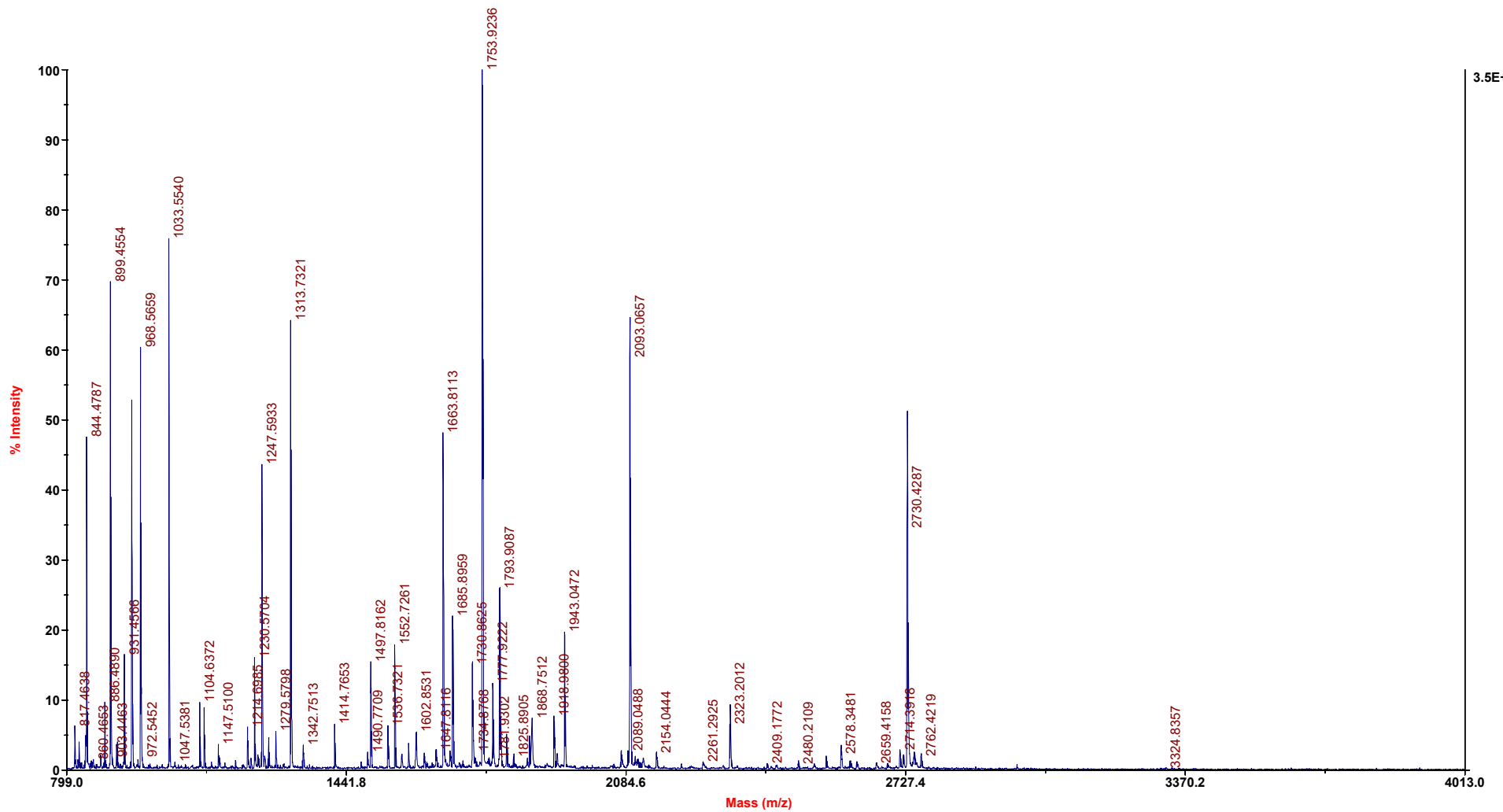


Time-of-Flight Mass Analyzer



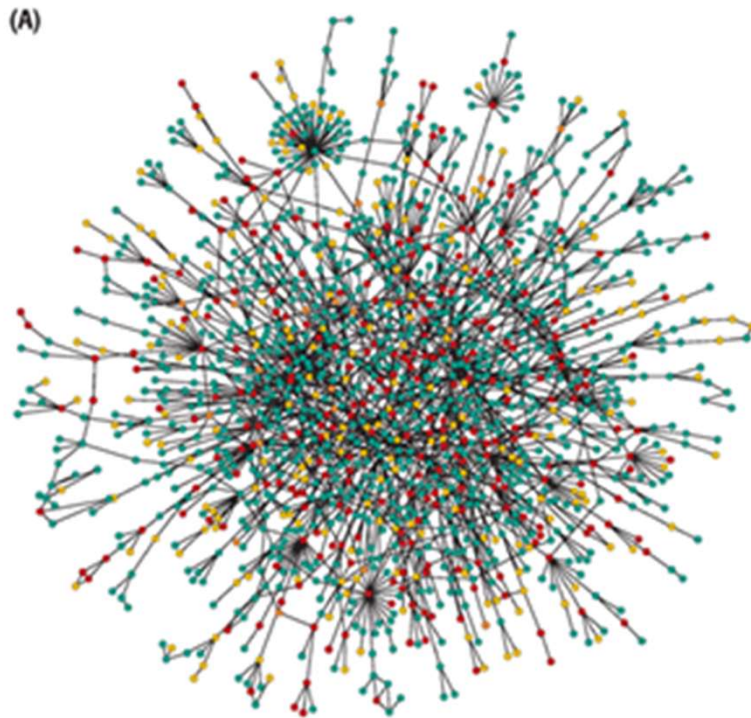
Il TOF e' un cronometro!

4700 Reflector Spec #1[BP = 1753.9, 34594]



Oltre il proteoma

L'Interattoma



Relativamente poche proteine generano **nodi** da cui partono molte interazioni. La maggior parte delle proteine contrae poche interazioni.

Le mutazioni inattivanti le proteine dei nodi possono essere letali (ridondanza).

Alcune proteine stanno in nodi da cui partono interazioni simultanee che sottostanno ad una funzione cellulare (nodi party).

Alcune proteine sono al centro di nodi che collegano tra di loro le reti di interazione delle singole funzioni cellulari (nodi date). Queste ultime sono il vero fulcro del proteoma e le loro mutazioni sono gravissime.

A Proteome-Scale Map of the Human Interactome Network

Thomas Rolland,^{1,2,19} Murat Taşan,^{1,3,4,5,19} Benoit Charlotheaux,^{1,2,19} Samuel J. Pevzner,^{1,2,6,7,19} Quan Zhong,^{1,2,8,19} Nidhi Sahni,^{1,2,19} Song Yi,^{1,2,19} Irma Lemmens,⁹ Celia Fontanillo,¹⁰ Roberto Mosca,¹¹ Atanas Kamburov,^{1,2} Susan D. Ghiassian,^{1,12} Xiping Yang,^{1,2} Lila Ghamsari,^{1,2} Dawit Balcha,^{1,2} Bridget E. Begg,^{1,2} Pascal Braun,^{1,2} Marc Brehme,^{1,2} Martin P. Broly,^{1,2} Anne-Ruxandra Carvunis,^{1,2} Dan Convery-Zupan,^{1,2} Roser Corominas,¹³ Jasmin Coulombe-Huntington,^{1,14} Elizabeth Dann,^{1,2} Matija Dreze,^{1,2} Amélie Dricot,^{1,2} Changyu Fan,^{1,2} Eric Franzosa,^{1,14} Fana Gebreab,^{1,2} Bryan J. Gutierrez,^{1,2} Madeleine F. Hardy,^{1,2} Mike Jin,^{1,2} Shuli Kang,¹³ Ruth Kiros,^{1,2} Guan Ning Lin,¹³ Katja Luck,^{1,2} Andrew MacWilliams,^{1,2} Jörg Menche,^{1,12} Ryan R. Murray,^{1,2} Alexandre Palagi,^{1,2} Matthew M. Poulin,^{1,2} Xavier Rambout,^{1,2,15} John Rasla,^{1,2} Patrick Reichert,^{1,2} Viviana Romero,^{1,2} Elien Ruyssinck,⁹ Julie M. Sahalie,^{1,2} Annemarie Scholz,^{1,2} Akash A. Shah,^{1,2} Amitabh Sharma,^{1,12} Yun Shen,^{1,2} Kerstin Spirohn,^{1,2} Stanley Tam,^{1,2} Alexander O. Tejada,^{1,2} Shelly A. Trigg,^{1,2} Jean-Claude Twizere,^{1,2,15} Kerwin Vega,^{1,2} Jennifer Walsh,^{1,2} Michael E. Cusick,^{1,2} Yu Xia,^{1,14} Albert-László Barabási,^{1,12,16} Lilia M. Iakoucheva,¹³ Patrick Aloy,^{11,17} Javier De Las Rivas,¹⁰ Jan Tavernier,⁹ Michael A. Calderwood,^{1,2,20} David E. Hill,^{1,2,20} Tong Hao,^{1,2,20} Frederick P. Roth,^{1,3,4,5,18,*} and Marc Vidal^{1,2,*}

ANSA.it TORNA SU ANSA.it

Scienza&Tecnica

NEWS DOSSIER GALLERIA FOTOGRAFICA VIDEO **ragazzi**

Spazio & Astronomia | Biotech | Tecnologie | Fisica & Matematica | Energia | Terra & Poli | Ricerca e Istituzioni | Libri | Ricerca nel Sud | Segui su

ANSA > Scienza&Tecnica > Biotech > Ricostruito il social network delle proteine umane

Ricostruito il social network delle proteine umane

Aiuta a scoprire i geni che causano i tumori

21 novembre, 10:55 G+ Tweet Consiglia 5

1 di 1

PUBBLICITÀ

Amicizie 'pericolose'

''Una volta scoperto che le proteine associate alla stessa malattia hanno una maggiore probabilità di essere interconnesse fra loro - spiega Roth - è possibile usare questo network di interazioni come strumento predittivo per trovare nuove proteine del cancro e i geni che le producono''.

Grazie a questa metodica, i ricercatori hanno verificato che ben 60 dei geni che avevano identificato come possibili cause di tumori rientrano realmente in quei circuiti molecolari che 'accendono' la malattia.

Manipolazione genetica nelle cellule di mammifero

Transgenesi

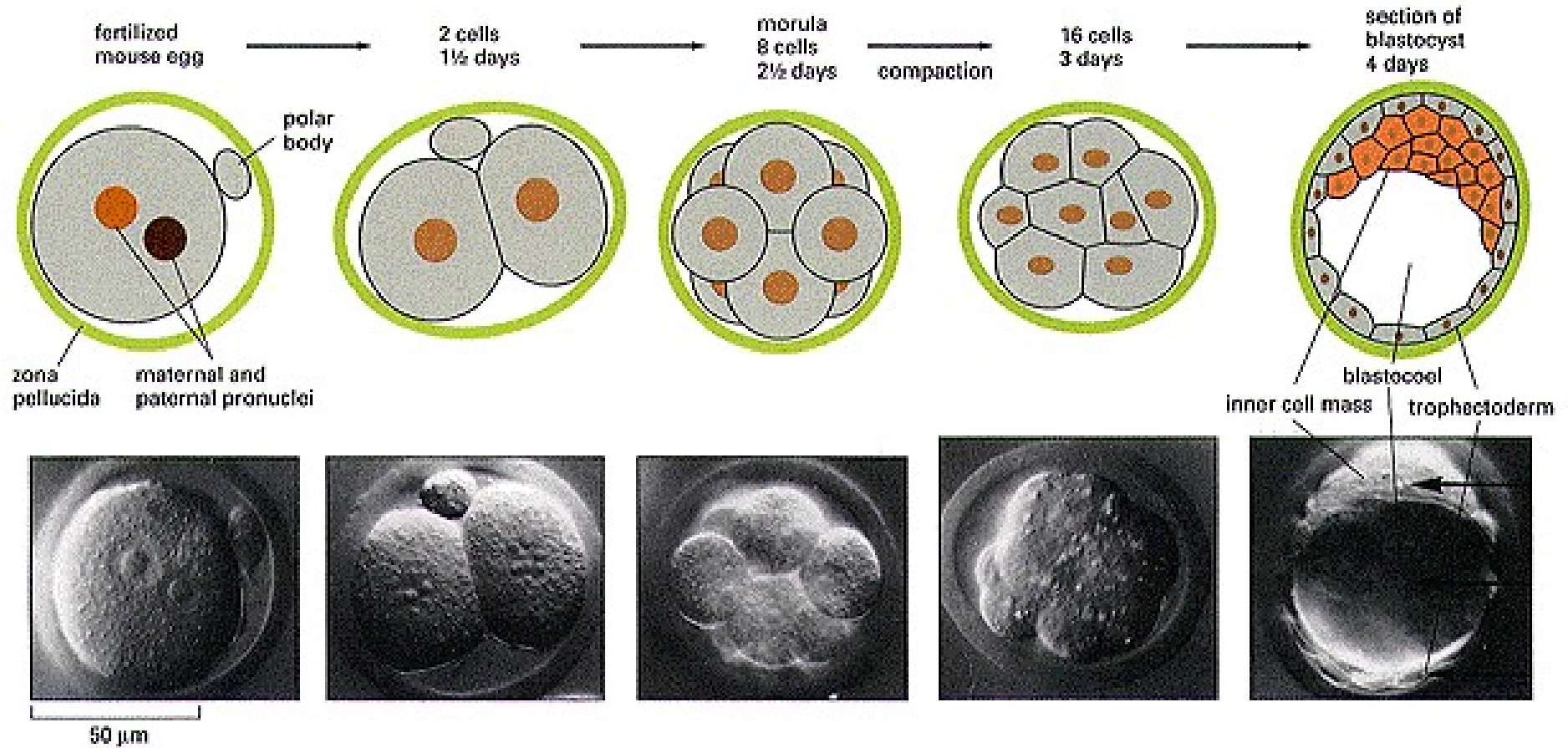
Silenziamento genico

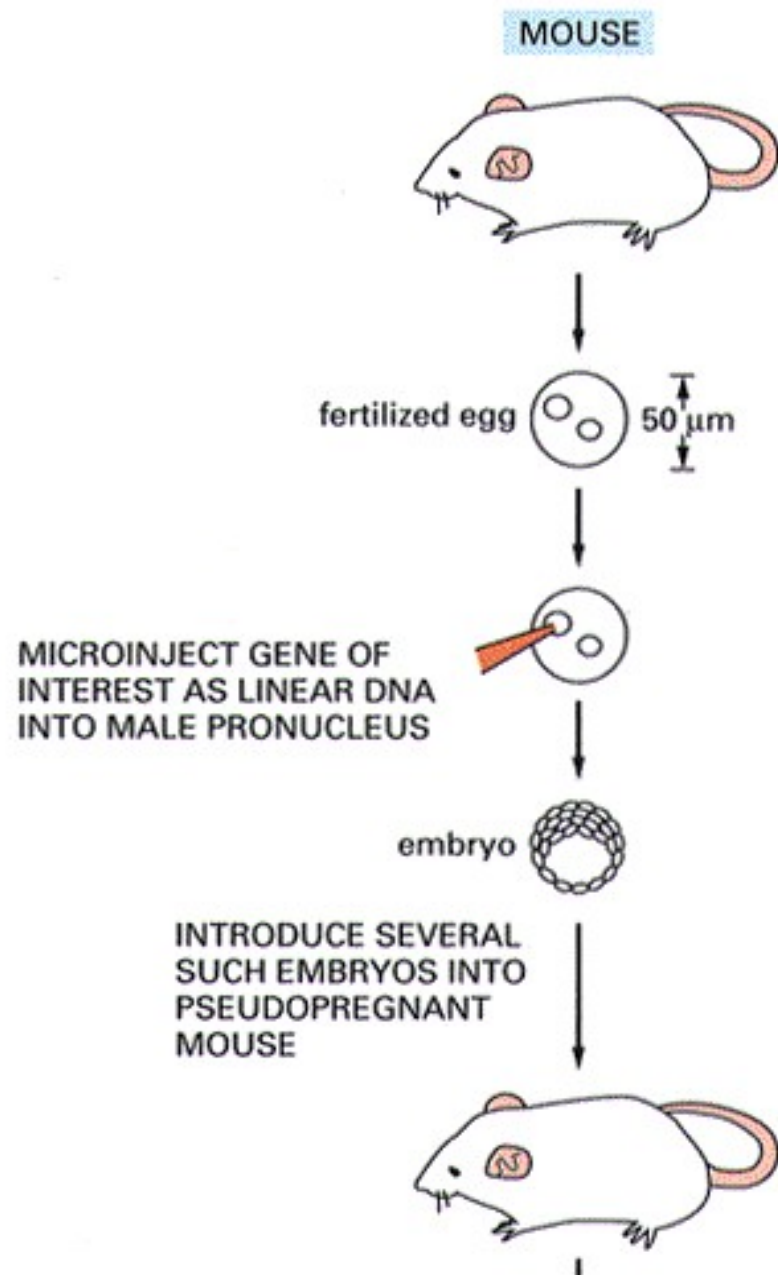
Editing genomico

Topo (*Mus musculus*)



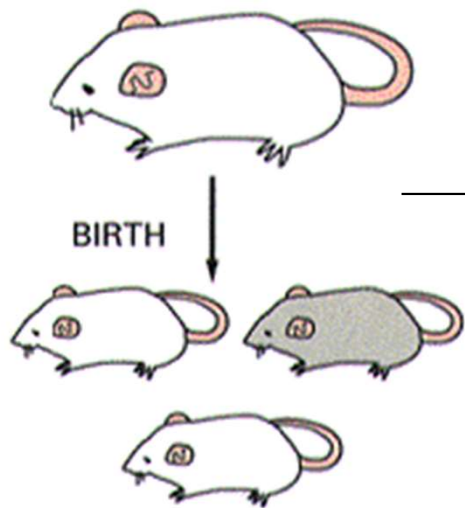
Sviluppo dello zigote fino allo stadio di blastocisti



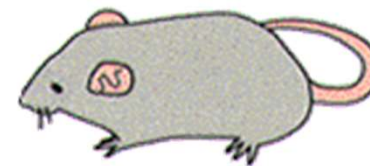


Topi transgenici

per microiniezione dell'uovo fecondato

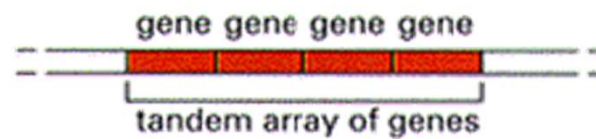


SOMATIC CELLS OF OFFSPRING
TESTED FOR PRESENCE OF GENE
AFTER BIOPSY, AND SELECTED
MOUSE BRED TO TEST FOR GENE
IN GERM CELLS

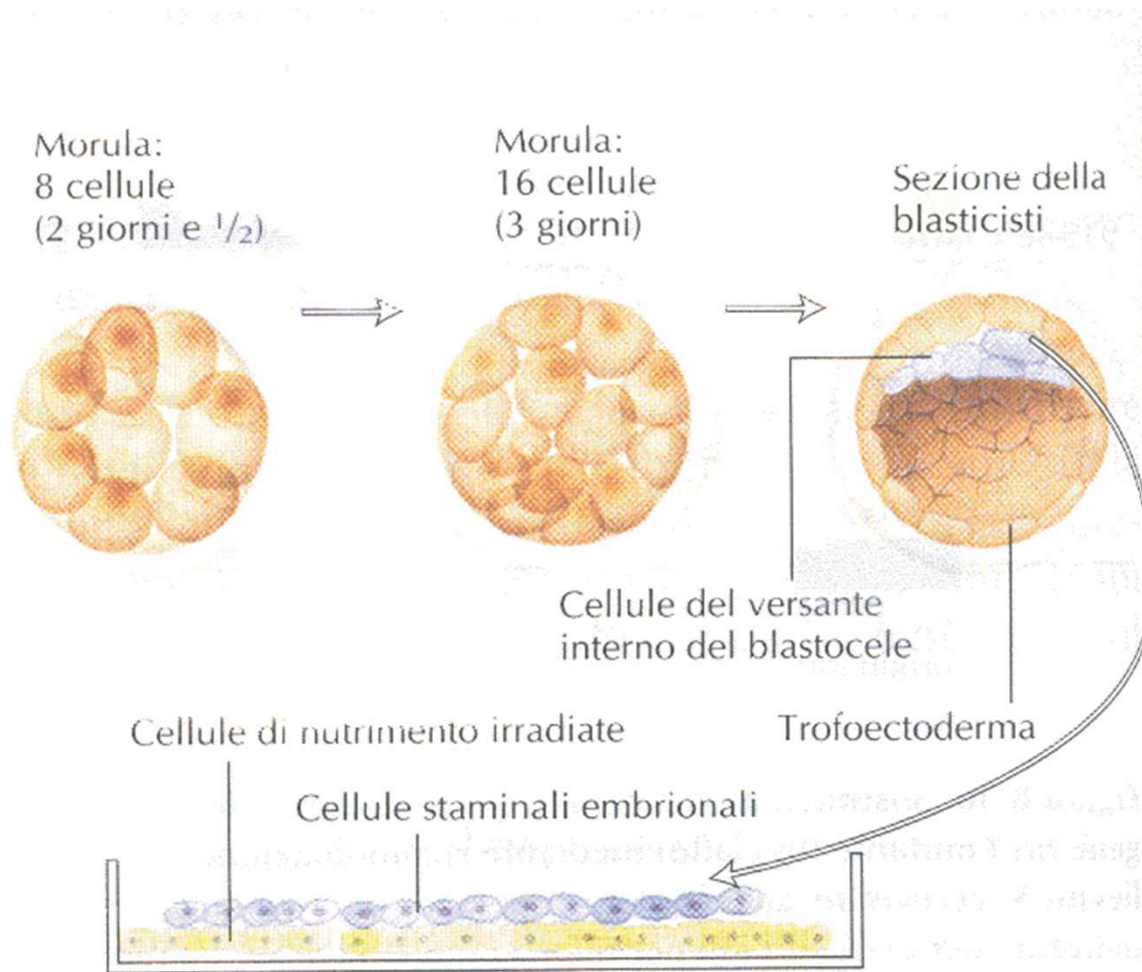


TRANSGENIC MOUSE

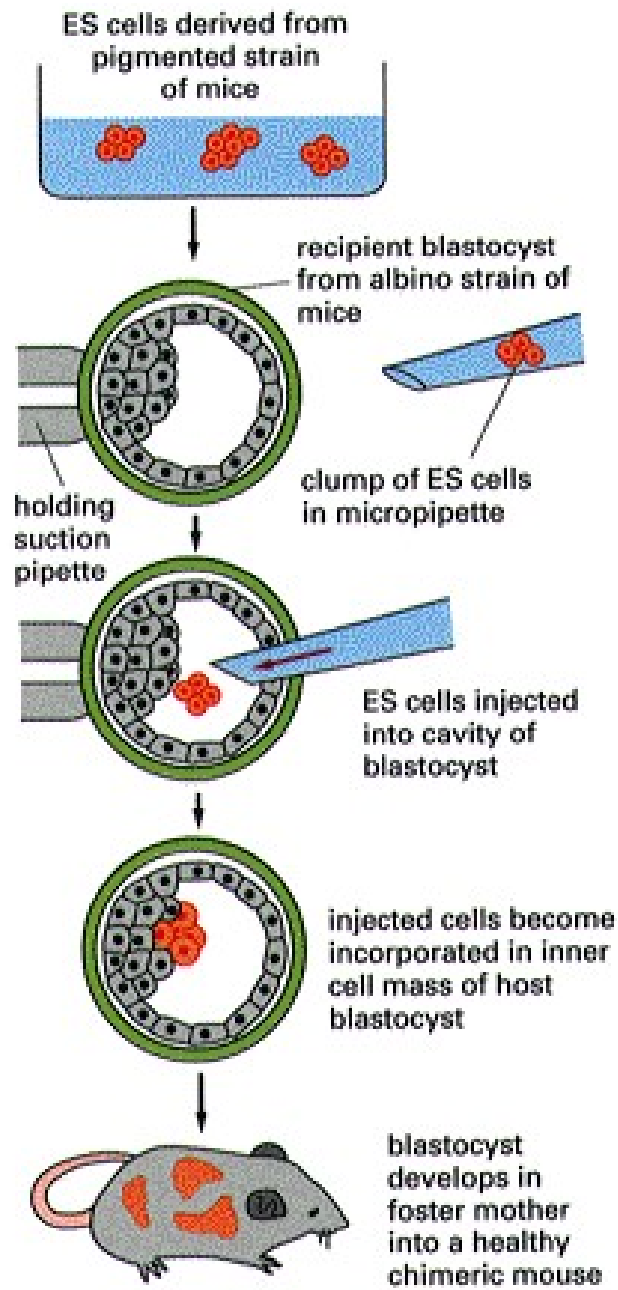
tandemly arranged copies of the gene
are inserted randomly into one
chromosome in each cell



Preparazione di cellule staminali embrionali (ES)



Le cellule uovo fecondate di topo all'inizio si dividono lentamente. Dopo quattro giorni e mezzo, formano la blastocisti, una struttura cava costituita da circa 100 cellule che circondano una cavità interna chiamata *blastocele*. Soltanto le cellule ES, che costituiscono la massa cellulare interna, formano effettivamente l'embrione. Altre cellule formano il trofoectoderma, che dà luogo alle membrane (amnion e placenta), mediante le quali l'embrione si attacca alla parete uterina. Le cellule staminali embrionali possono essere rimosse dalla blastocisti e fatte crescere su cellule di nutrimento (*feeder cells*) trattate con una dose letale di radiazioni. [Vedi E. Robertson et al. (1986), *Nature* 323: 445].



Lezione 13 marzo 2023

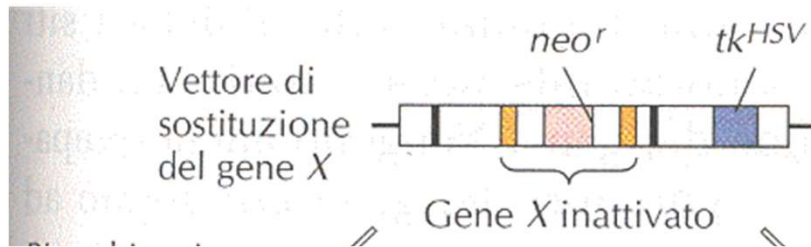
Token 542539

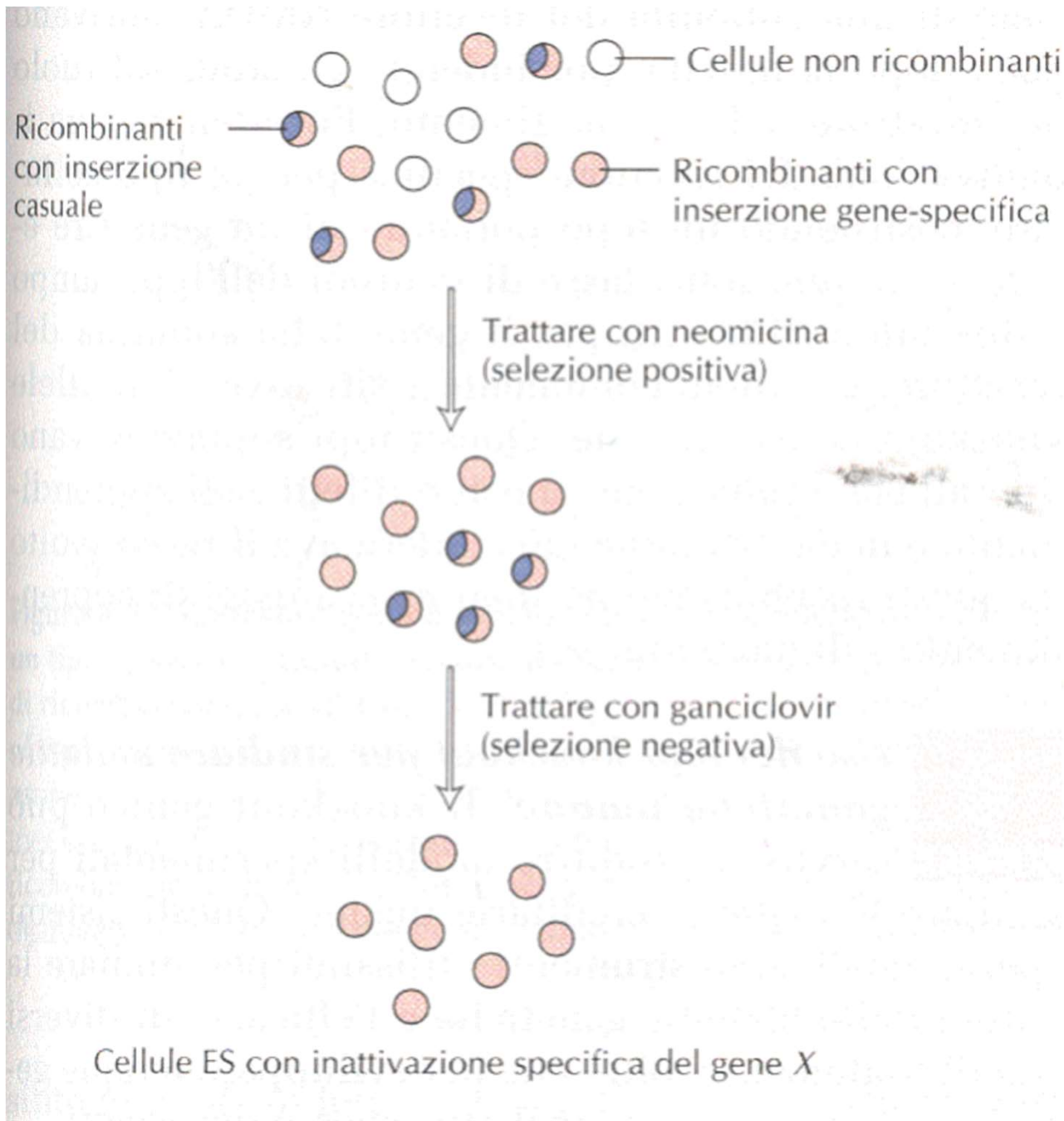
Il primo topo knockout fu creato da *Mario Capecchi, Martin Evans ed Oliver Smithies* alla fine degli anni ottanta, ed è valso loro il Premio Nobel per la medicina l'8 ottobre 2007.



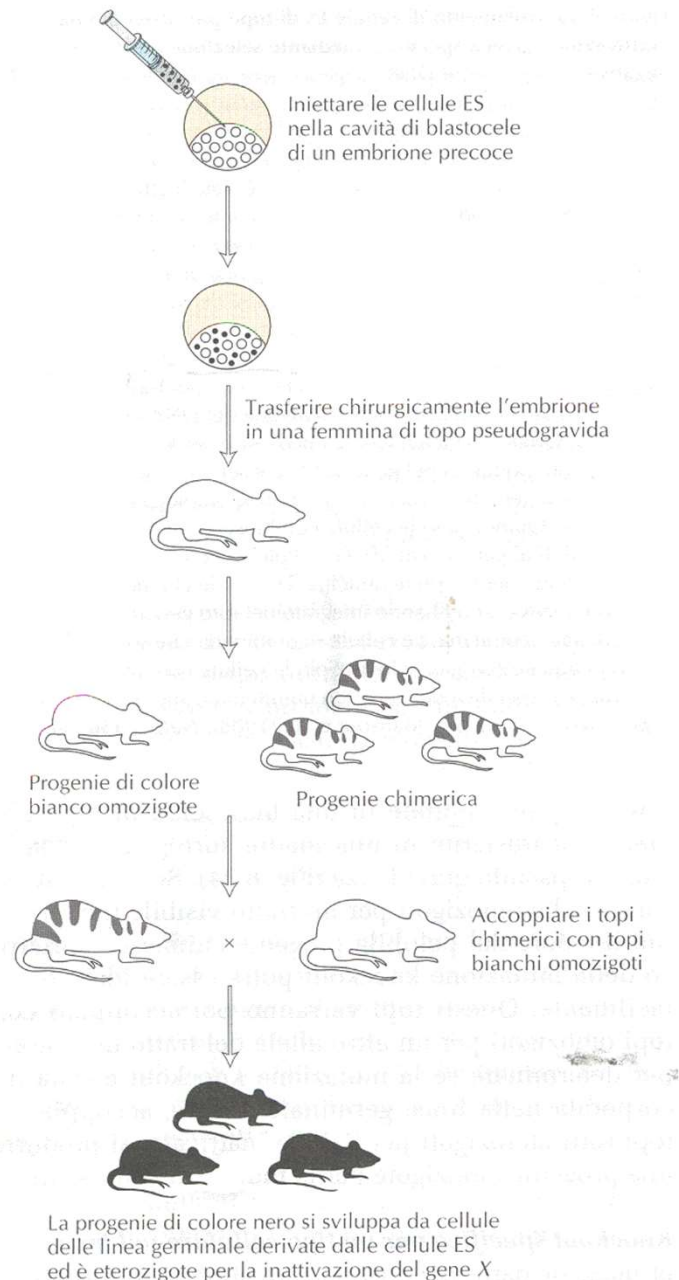
Courtesy of Dr. M. Capecchi, Eccles Institute of Human Genetics.
Noncommercial, educational use only.

Costrutto finalizzato ad una mutazione knock-out





**Selezione
positiva e
negativa delle
cellule ES
ricombinanti
portatrici di
una mutazione
knock-out**



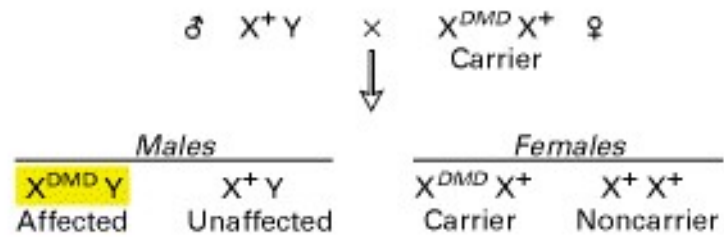
Inoculo in blastocisti di cellule staminali embrionali knock-out e trasferimento degli embrioni in madri pseudogravide

Le cellule staminali embrionali (ES) eterozigoti per una mutazione knockout in un gene di interesse (X) e omozigoti per un gene marker (in questo caso il colore nero del mantello) vengono trapiantate nel blastocite di un embrione di quattro-cinque giorni, omozigote per un marcatore alternativo (in questo caso il colore bianco del mantello). Gli embrioni a uno stadio precoce vengono quindi impiantati in una femmina pseudogravida. Alcuni dei discendenti sono chimere, indicate dal mantello bianco e nero. I topi chimerici vengono quindi incrociati con topi omozigoti per il colore bianco del mantello; i figli di questo incrocio che avranno mantello nero possederanno nella loro linea germinale cellule derivate dalle ES. Isolando il DNA da una piccola quantità di tessuto della coda, è possibile identificare i topi neri eterozigoti per l'allele knockout. Incrociando tra loro questi topi neri si ottengono individui omozigoti per l'allele inattivato, cioè topi knockout. [Adattato da M.R. Capecchi (1989), *Trends Genet.* 5: 70.]

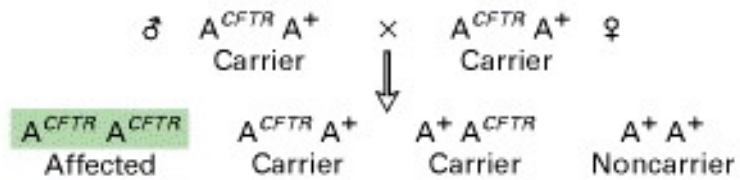
To date, about 11,000 genes have been knocked out in mice, which accounts for roughly half of the mouse genome (Vogel, 2007; Sikorski and Peters, 1997). Through a combination of gene targeting and gene trapping, a global effort is underway to make a knockout mouse for all of the 25,000 mouse genes (Grimm, 2006).

Malattie genetiche umane di cui esistono modelli murini knockout

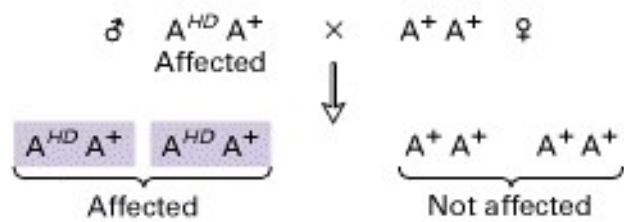
(a) Duchenne muscular dystrophy



(b) Cystic fibrosis



(c) Huntington's disease



Topi Knock-out condizionali

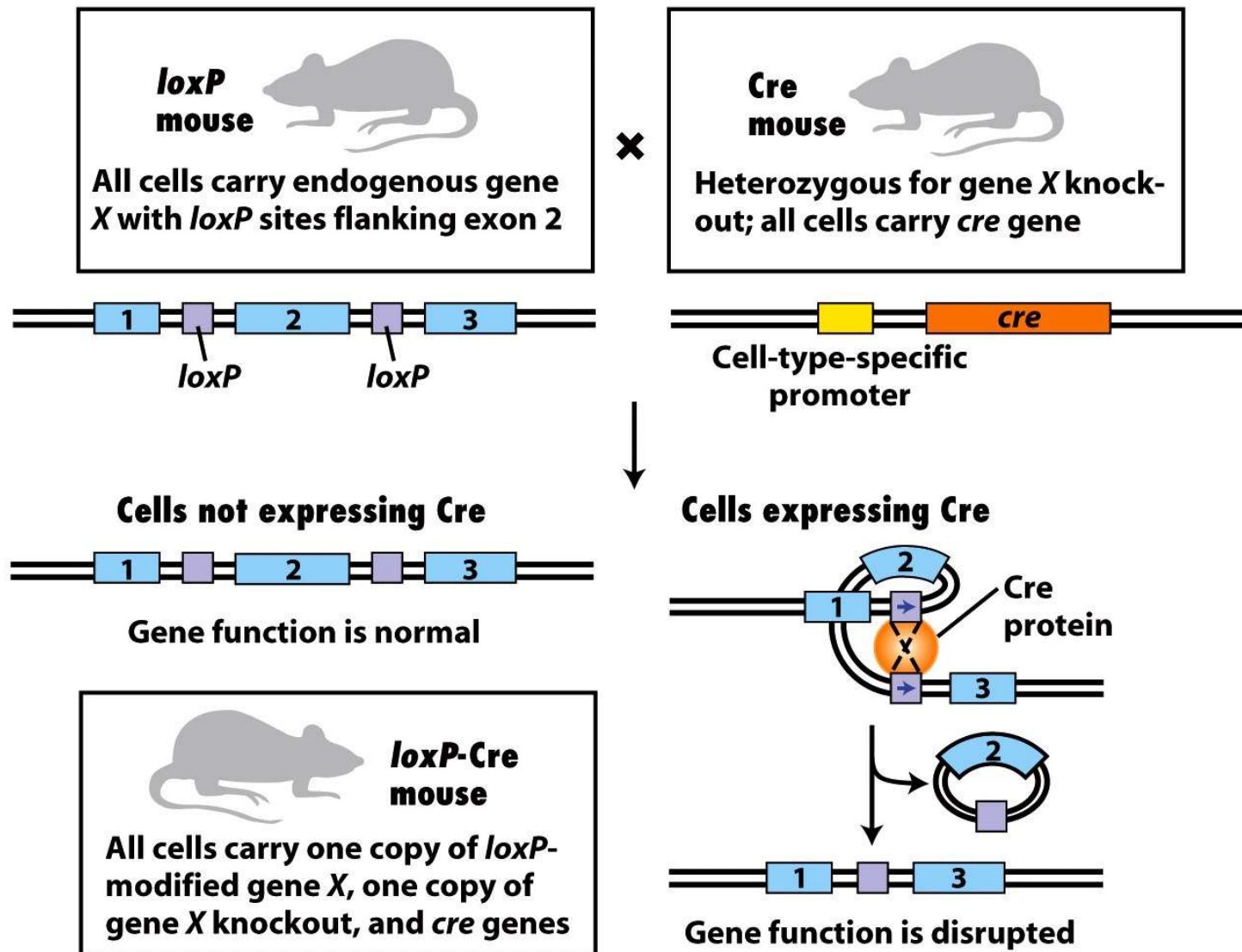


Figure 5-42
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

MUTANTI CONDIZIONALI PER LO STUDIO DEL TUMORE MAMMARIO

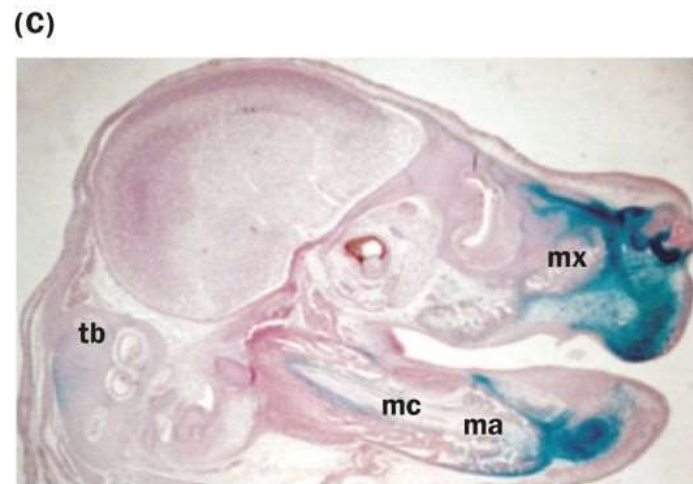
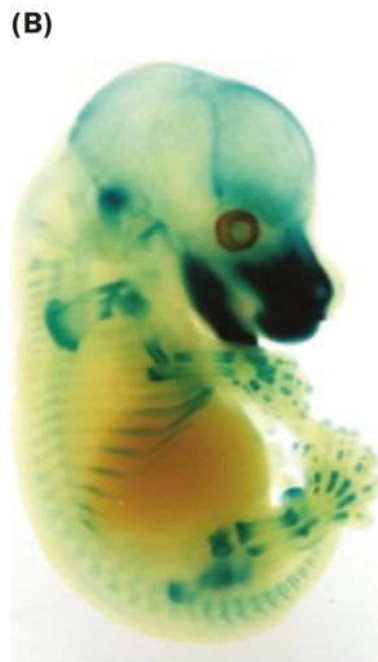
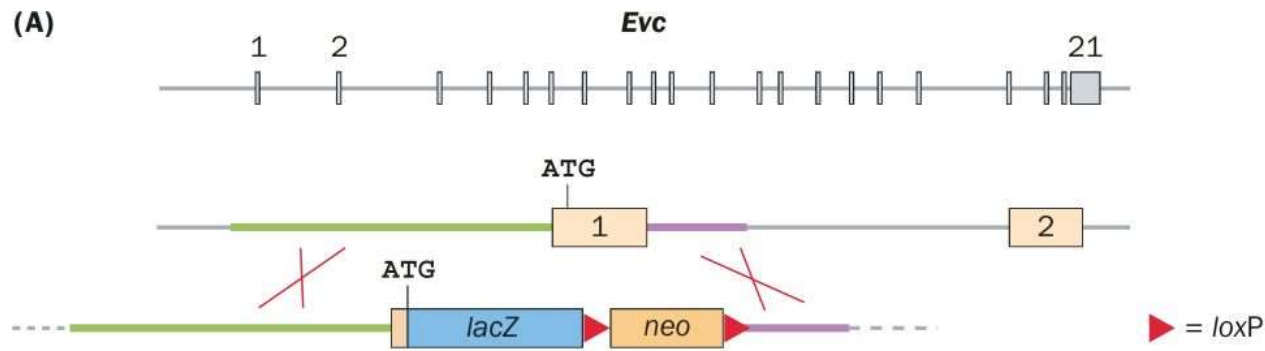
Nel 50% dei casi di tumore mammario familiare sono state riscontrate mutazioni del gene Brca1.

La mancanza di Brca1 causa una precoce mortalità embrionale

Mutante condizionale in cui si determina la rimozione dell'esone11 di Brca1 solo nelle cellule epiteliali del tessuto mammario

Topo Knock/in:

l' esempio della patologia umana da deficit
dell'alfa1-antitripsina



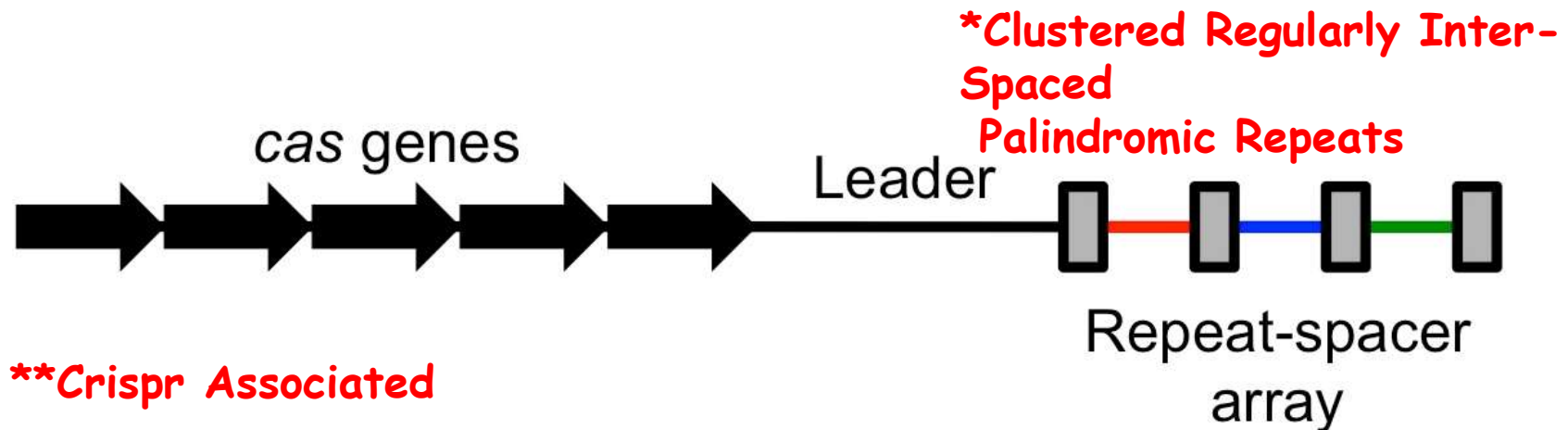
Knock/in del transgene reporter lacZ per inattivare un gene X e monitorarne contemporaneamente la sua normale espressione

Sono centinaia i modelli animali di malattie umane a carattere monogenico attualmente disponibili

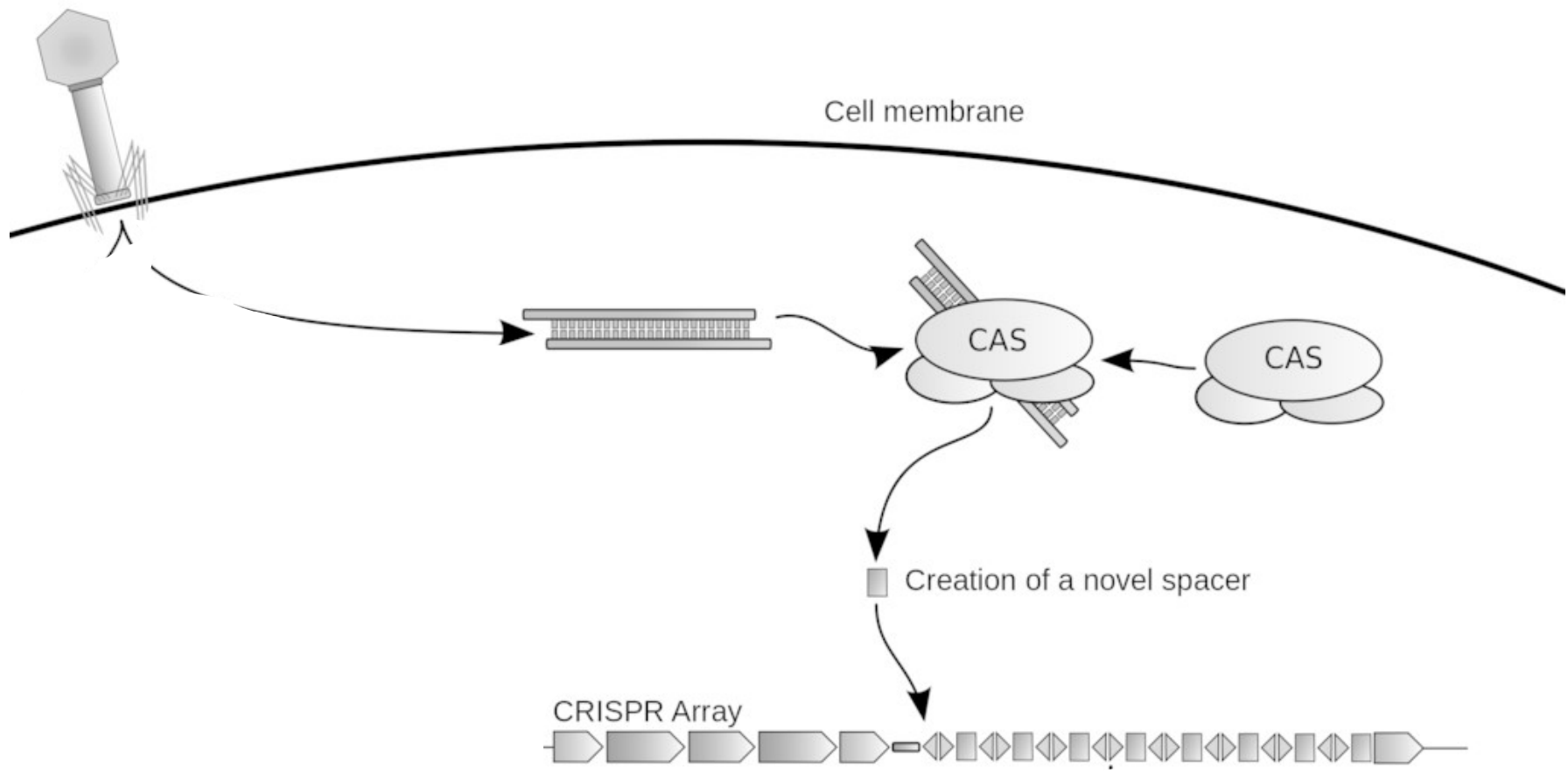
Malattie metaboliche e ormonali	Fibrosi cistica	K	<i>Cftr</i>
	Ipercolesterolemia familiare	K,T	<i>Ldlr</i>
	Arteriosclerosi	K	<i>Fmr1</i>
Malattie immunologiche ed ematologiche	Emofilia A	K	<i>C/8</i>
	Talessemia α	K	<i>Hba</i>
	Talessemia β	K	<i>Hbb</i>
Malattie della vista e dell'udito	Retinite pigmentosa	T	<i>Rho</i>
	Degenerazioni della retina	T	<i>Prph2</i>
Disfunzioni della cresta neurale	Albinismo oculocutaneo	T	<i>Tyr</i>
	Sindrome di Waardenburg	K	<i>Mitf^{mi}</i>
Malattie neurologiche e neuromuscolari	Morbo di Alzheimer	K,T	<i>App</i>
	Ataxia telangiectasia	K	<i>Atm</i>
	Sindrome X fragile	K	<i>Fmr1</i>
Sindromi familiari di predisposizione al tumore	Retinoblastoma familiare	K	<i>Rb</i>
	Poliposi adenomatosa del colon	K	<i>Apc</i>
	Sindrome di Li-fraumeni	K	<i>p53</i>
	Sindrome di Gorlin	K	<i>Ptch</i>

Genome Editing

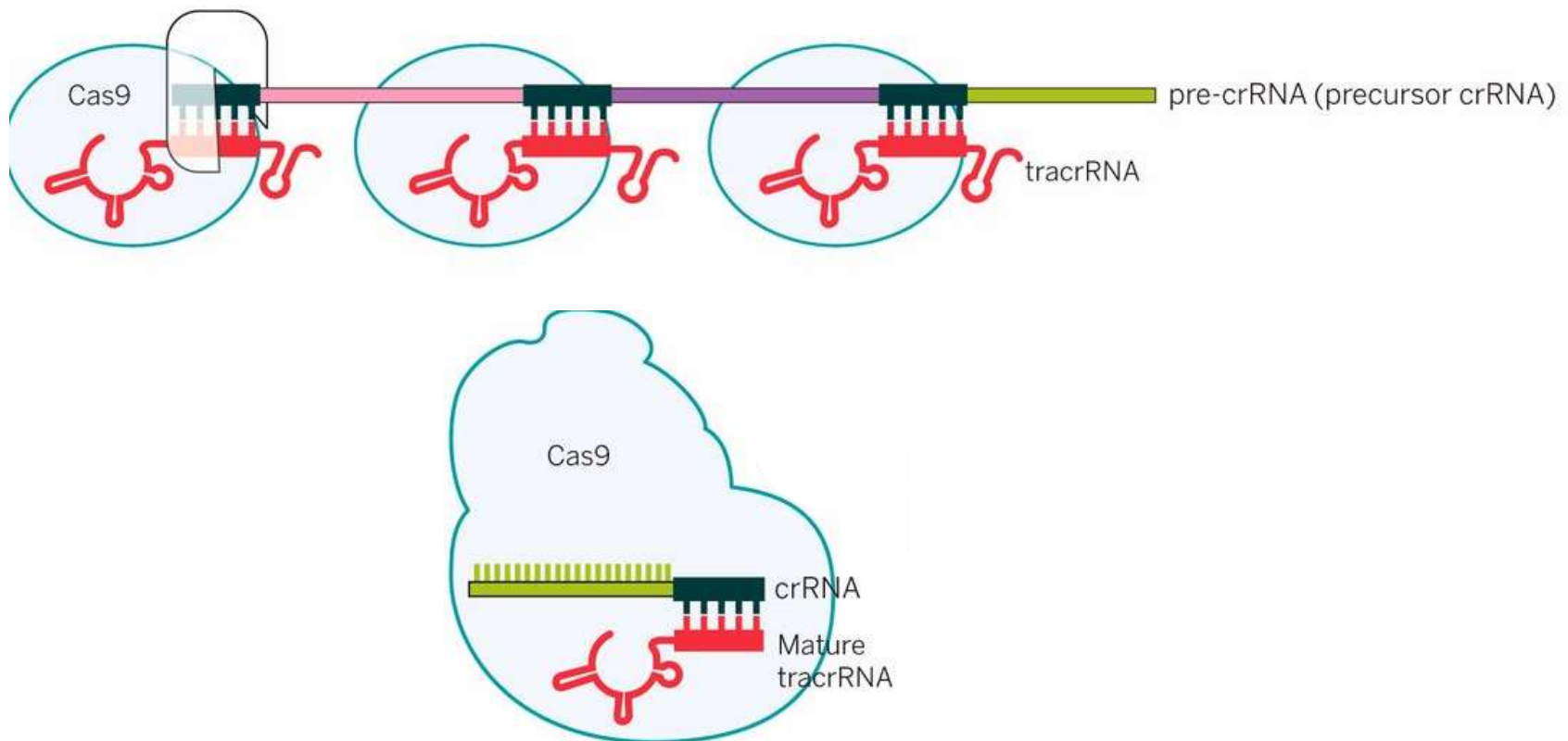
Il sistema CRISPR*-Cas9**



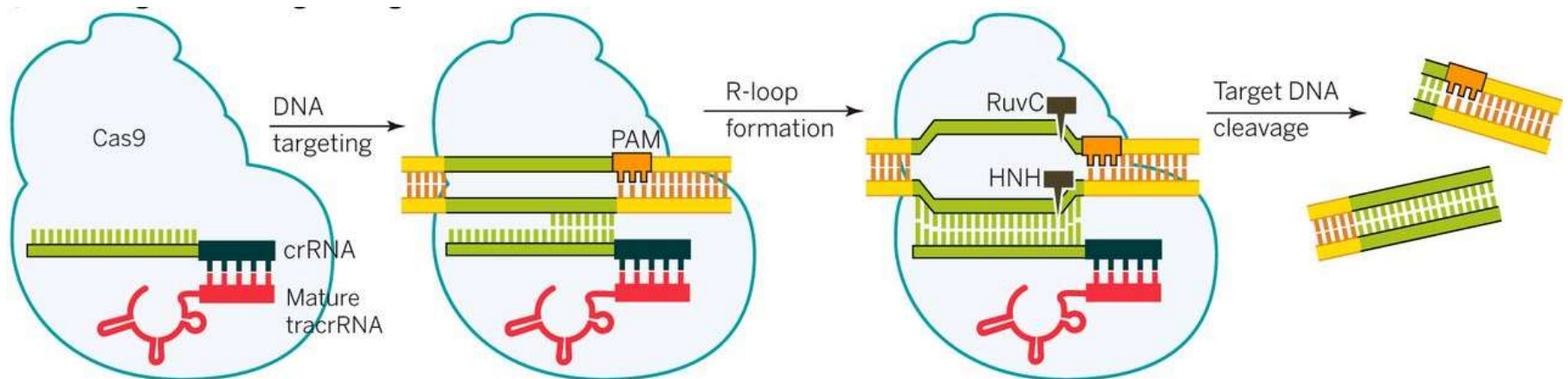
Sistema immunitario batterico scoperto come tale nel 2005 quando si notò che le sequenze spaziatrici hanno origine plasmidica o virale e che i geni associati a questa regione codificano per proteine con domini elicasi e nucleasici. Nel 2008 si è scoperto che RNAs derivati dalle CRISPR (crRNAs) complessati con proteine Cas interferivano con la proliferazione di virus infettanti E. Coli



L'endonucleasi **CAS9** si lega al trascritto pre-crRNA.
Per il legame di Cas9 e per il successivo processamento dei singoli crRNAs è necessaria una piccola molecola di RNA (il **trans-activating crRNA**) codificata da una sequenza a monte del locus Cas.

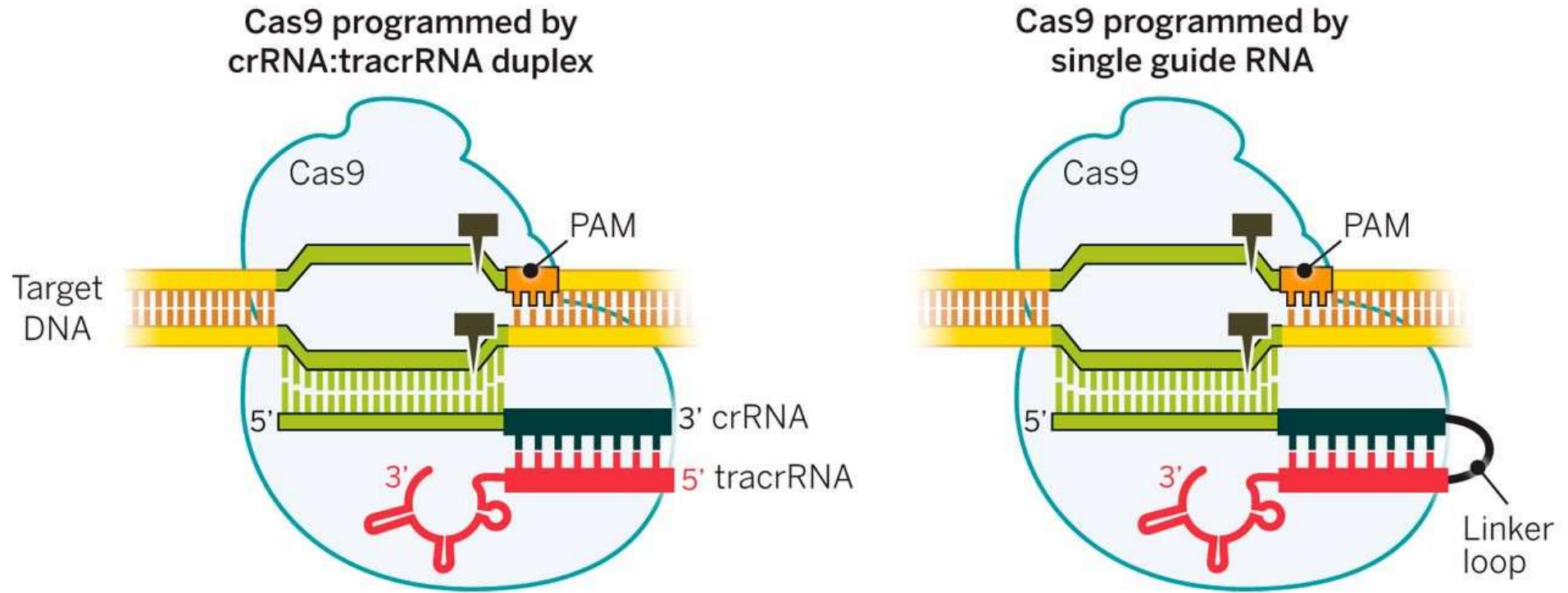


Il **complesso Cas9/tracrRNA/crRNA** raggiunge il DNA target che viene legato per complementarità con una sequenza del crRNA lunga 20 nt.

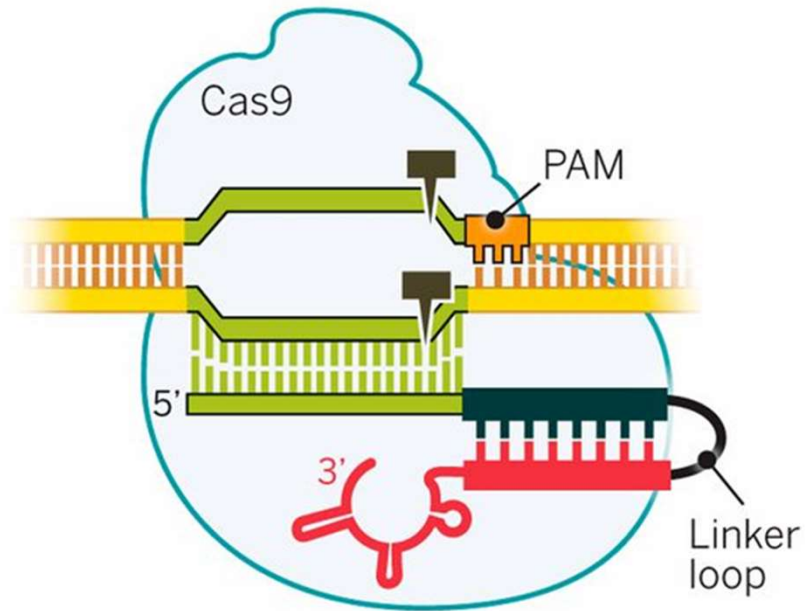


I due strand del DNA target vengono riconosciuti e tagliati da due diversi domini della Cas9 (HNH per lo strand complementare al crRNA e RuvC per lo strand opposto).

Ingegnerizzazione del doppio trascritto
tracrRNA/crRNA in un **singolo RNA guida (sgRNA)**



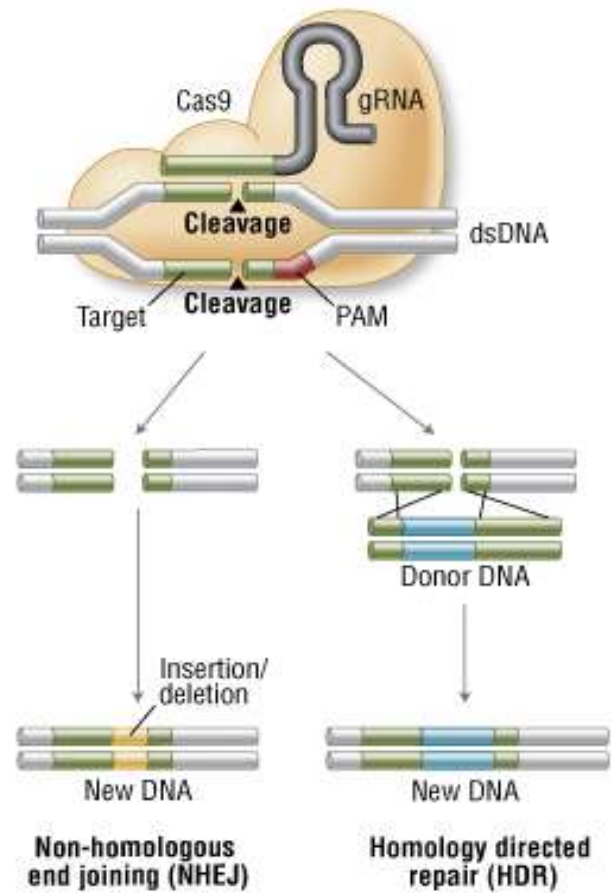
Cas9 programmed by single guide RNA



La semplice modifica della sequenza di 20 nt potrà targettare Cas9 su qualsiasi sequenza di DNA

Se si spinge la cellula a scegliere «**Homology Directed Repair (HDR)**» piuttosto che «Non-Homologous End-Joining (NHEJ)» e si fornisce un DNA template che può essere utilizzato per il riparo, il genome editing può produrre mutazioni specifiche, non solo K.O. ma anche gain of function.

A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



C. Localization With Defective Cas9 Nuclease

